

cited in the European Search
Report of EP 03 72 4238 5
Your Ref.: JP-C5016-PC-11P

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 12 月 21 日 (21.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/77253 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12M 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP99/03209

(22) 国際出願日: 1999 年 6 月 16 日 (16.06.1999)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立製作所 (HITACHI, LTD.) [JP/JP]; 〒101-8010 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松永浩子 (MAT-SUNAGA, Hiroko) [JP/JP]. 村川克二 (MURAKAWA,

Katsuji) [JP/JP]. 岡野和宣 (OKANO, Kazunori) [JP/JP]. 宮原裕二 (MIYAHARA, Yuji) [JP/JP]; 〒185-8601 東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地 株式会社日立製作所 中央研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士 作田康夫 (SAKUTA, Yasuo); 〒100-8220 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 株式会社日立製作所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

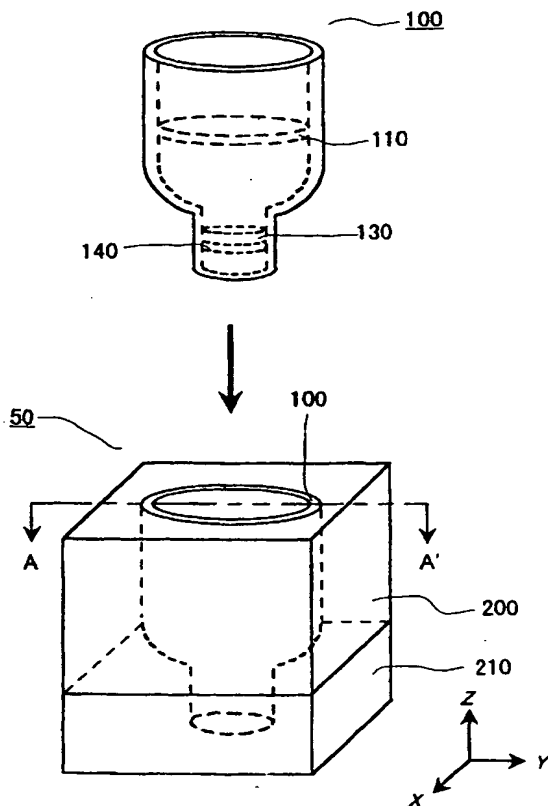
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR GENE EXAMINATION

(54) 発明の名称: 遺伝子検査装置及び遺伝子検査方法



(57) Abstract: An apparatus (50) for preparing samples consisting of a sample preparation unit (100) having an upper opening, into which a buffer having cells suspended therein is poured, a lower opening, from which a waste liquor is discharged, and a channel connecting these openings, provided with a first filter (110) for capturing cells, a second filter (130) for capturing polynucleotides eluted from the cells with a denaturing agent poured into the upper opening and holding a PCR amplification reaction mixture containing a fluorescence-labeled primer for PCR and a PCR amplification reaction reagent for amplifying the copy of a desired partial base sequence in the polynucleotide, and a third hydrophobic filter (140), wherein these filters are arranged in this order from the upper opening toward the lower opening; a member (200) for holding the sample preparation unit; and a member (210) for controlling the temperature of the PCR amplification reaction mixture. By using this apparatus, a series of steps including the pretreatment of specimen samples, PCR amplification and the detection of the PCR product can be continuously performed. Thus, the contamination at each step can be prevented and a number of specimens can be easily treated simultaneously.

[続葉有]

WO 00/77253 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明の試料調製装置（50）は、細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、上部開口から下部開口の方向に流路にそれぞれ順次配置される、細胞を捕捉する第1のフィルタ（110）と、上部開口から注入された変性剤により細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含みポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタ（130）と、疏水性の第3のフィルタ（140）とを有する試料調製ユニット（100）と、試料調製ユニットを保持する保持手段（200）と、PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段（210）とを具備する。検体試料の前処理から、PCR増幅、PCR産物の検出までの各工程を、連続して実行でき、各工程の間でのコンタミネーションを防止でき、多検体の同時処理を容易にする。

明 細 書

遺伝子検査装置及び遺伝子検査方法

技術分野

本発明は、全血又は細胞培養液を利用した遺伝子診断を行なうための試料調製を行なう試料調製装置、試料調製から目的遺伝子の検出までを簡便に行なう遺伝子検査装置及び遺伝子検査方法に関する。

背景技術

1980年代にヒトゲノムプロジェクトが全世界的に開始され、21世紀初頭には全ゲノム配列情報が得られるとされている。全ゲノム配列情報が得られると、正常か異常かを遺伝子レベルで比較判定が可能となり、遺伝子工学を用いた遺伝子検査法及び遺伝子治療法の開発が飛躍的に進むものと思われる。現在、遺伝子関連疾患は、8,450種にも昇るとされている。この事実にも関わらず、日本に於いて保険の採用が現在認められている遺伝子検査は、感染症の一部に限定されている。これは、遺伝子異常による疾患は、単一異常に基づく遺伝病よりもむしろ多因子性である可能性が高いことにある。このため広範多岐にわたる遺伝子検査が必要となり、高額な検査が必要となり医療経済上問題があるためである。また、検査方法が確立されておらず、何時でも何処でも安定した検査が実行できる状態に無いことが原因となっている。

ターゲット遺伝子を検出する上で有効となる遺伝子分析技術、Polymerase Chain Reaction法（PCR法）は、微量の遺伝子を効率良く増幅できる技術であり、検出の感度を飛躍的に改良できる。

組織や全血中からDNAやRNAを抽出するキットが、QIAGEN社（ドイツ）やSTRATAGENE社（米国）等から複数発売されている。抽出に要する作業時間は3.0分程度から3時間程度であり、キットによりま

ちまちである。自動核酸抽出装置が、東洋紡社や倉敷紡績社等から発売されている。また、リアルタイムにPCR産物を検出する装置として、ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer社(米国))、Light Cycler™ (ロシュ・ダイアグノスティック社(ドイツ))等がある。

特開平4-207195号公報に、ウイルスを含む懸濁液中にウイルス吸着樹脂を加えてウイルスを捕捉後、樹脂をフィルタ上に分離しウイルス溶解液を流通させてウイルスの核酸成分を含む液を回収し、ウイルス検査用等の核酸成分を採取する、ウイルスの核酸成分採取方法、及びウイルス検査法が報告されている。

特開平4-36198号公報に食中毒菌の検査方法が報告されている。特開平4-36198号公報に記載の検査方法では、細菌を含む懸濁液を粗い第1のフィルタに通し不溶性固形分を分離する。次に濾液に溶菌剤を加え菌体成分を遊離させる。そして、第2のフィルタによってさらに細かい不溶性固形分を除去する。ここで得られた濾液に核酸成分凝集剤を加え、核酸成分沈殿させ更に第3のフィルタ内に核酸成分を捕捉する。これを洗浄し、水溶液を第3のフィルタ中に流入させ、核酸成分を溶出させる。溶出させた核酸成分をポリメラーゼ連鎖反応に付して所望の菌のDNAを増幅させることにより所望の食中毒菌の検査を行なう。

特開平7-98314号公報に便潜血測定装置が報告されている。特開平7-98314号公報に記載の便潜血測定装置では、便試料溶解液は、まず分離フィルタによって固形成分が除去される。しかる後、固形成分が除去された便試料溶解液は測定フィルタに滴下される。測定フィルタ上では、便潜血が存在する場合には、血中Hbと第1、第2抗体とが反応し、サンドイッチ法により免疫複合体が形成される。その結果、測定フィルタが着色される。他方、便潜血が存在しない場合には、測定フィルタは非着色状態となる。従って、測定フィルタの着色に有無を肉眼で判断することにより、便潜血の有無を簡単に判定することができる。

発明の開示

現在、検体からのDNA又はRNAの抽出から、PCR及び検出までを全自動で実行できるシステムは未だ存在しない。マニュアル操作による作業では、工程間で夾雑物のコンタミネーションの可能性が多分にあり、検査結果が全く違うものにもなりかねないという問題がある。従来技術の装置、キットは、いずれも完全自動化にはほど遠く、抽出のみ、PCR増幅、PCR産物の検出のみ、といった特定の工程を行なうのみであり、容易に、何時でも、何処でも、安定した検査を行なうという検査の現場での要求を満足するものではなかった。即ち、現存のキット又は装置では、前処理から検出までを一体のアプリケーションで行なうことができないという問題があった。

以上に説明したように、現存のキット又は装置を用いた場合、DNA又はRNAの抽出を行なう前処理から、PCR増幅、PCR産物の検出を行なう各工程を同一のアプリケーションユニットを使用して実行できず、数種類のアプリケーションユニットを用いる必要があり、各工程の間で、夾雑物のコンタミネーションの可能性が非常に高くなるという問題があった。

本発明の目的は、検体試料の前処理工程から、PCR増幅工程、PCR産物の検出工程までの各工程を、同一のアプリケーションユニット（試料調製ユニット）を使用して実行でき、各工程間でのコンタミネーションを防止できるばかりでなく、多検体同時処理を容易にする遺伝子診断用の遺伝子検査装置、遺伝子検査方法、試料調製装置を提供することにある。

本発明では、細胞捕捉用フィルタ、及びポリヌクレオチド捕捉用フィルタが予めセットされた試料調製ユニット（アプリケーションユニット）を複数有する試料調製装置を用いる。各試料調製ユニットに、全血又は細胞培養液に細胞用緩衝溶液を加えたものを注ぎ、続いて変性剤を加え、更にPCR増幅反応溶液を加え、目的遺伝子の増幅、及び検出までの操作を連続して実行できる。検体試料の前処理工程から、PCR増幅工程、PCR産物の検出工程までの各工程を、同一試料調製ユニットで実行でき、各工程間でのコンタ

ミネーションを防止でき、多検体同時処理を容易にできる。

本発明の代表的な構成は以下の特徴を有する。

(C 1) 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、前記細胞を捕捉する第 1 のフィルタと、前記上部開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識された P C R 用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させる P C R 増幅反応のための試薬を含む P C R 増幅反応溶液を保持する第 2 のフィルタと、疎水性の第 3 のフィルタとを有する試料調製ユニットを 1 又は複数具備し、前記試料調製ユニットを保持する保持手段と、前記 P C R 増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備する試料調製装置と、前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記第 2 のフィルタにほぼ垂直又はほぼ平行な方向から前記 P C R 増幅反応溶液に照射する照射手段と、前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記第 2 のフィルタにほぼ垂直な方向から検出する検出手段とを有する遺伝子検査装置。

(C 2) 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、前記細胞を捕捉する第 1 のフィルタと、前記上部開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識された P C R 用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させる P C R 増幅反応のための試薬を含む P C R 増幅反応溶液を保持する第 2 のフィルタと、疎水性の第 3 のフィルタとを有する試料調製ユニット。

(C 3) 上部開口と下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、第 1 のフィルタと、第 2 のフィルタと、疎水性の第 3 のフィルタとを有する試料調製ユニットを 1 又は複数具備する試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって、(1)

前記試料調製ユニットの前記上部開口に、細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記第1のフィルタに前記細胞を捕捉する工程と、(2)前記上部開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出させたポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)前記上部開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を前記第2のフィルタに保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記PCR増幅反応溶液に照射して前記蛍光標識からの蛍光を検出する工程とを有する遺伝子検査方法。

(C4)細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部に形成された第1の開口と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の部材と、上部に第2の開口を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の部材と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段を具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置される複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C5)上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の部材と、上部に第2の開口を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の部材と、貫通孔を有し透明な第4の部材と、前記PCR増幅反応

溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第 1 の部材、前記第 4 の部材、前記第 2 の部材、前記第 3 の部材の順に配置され、前記第 1 のフィルタと前記第 2 のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第 2 のフィルタと前記第 3 のフィルタとが対向して構成される複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C 6) 第 1 の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第 1 の開口と、前記第 1 の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第 1 のフィルタとを有する第 1 の部材と、上部に第 2 の開口を有し前記第 1 の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識された P C R 用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させる P C R 増幅反応のための試薬を含む P C R 増幅反応溶液を保持する第 2 のフィルタを下部に有する第 2 の部材と、疏水性の第 3 のフィルタを有する第 3 の部材と、前記 P C R 増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第 1 の部材、前記第 2 の部材、前記第 3 の部材の順に配置され、前記第 1 の貫通孔と前記第 2 の開口とが対向し、前記第 2 のフィルタと前記第 3 のフィルタとが対向して配置され、前記第 1 のフィルタと前記第 2 のフィルタとを結ぶ流路が形成される複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C 7) 第 1 の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第 1 の開口と、前記第 1 の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第 1 のフィルタとを有する第 1 の部材と、前記第 1 の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識された P C R 用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させる P C R 増幅反応のための P C R 増幅反応試薬を含む溶液を保持する第 2 のフィルタを有する第 2 の部材と、疏水性の第 3 のフィルタを有する第 3 の部材と、第 2 の貫通孔と上部に第 2 の開口を有する透明な第 4 の部材と、前記 P C R 増幅反応試薬の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第 1 の部材、前記第 4 の部材、前記第 2 の部材、前記第 3 の

部材の順に配置され、前記第 1 の貫通孔と前記第 2 のフィルタとが前記第 2 の貫通孔を介して対向し、前記第 2 のフィルタと前記第 3 のフィルタとが対向して配置され、前記第 1 のフィルタと前記第 2 のフィルタとを結ぶ流路が形成される複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C 8) 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第 1 の開口と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第 1 のフィルタとを有する第 1 の領域が複数形成される第 1 の部材と、上部に第 2 の開口を有し前記第 1 の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識された P C R 用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させる P C R 増幅反応のための試薬を含む P C R 増幅反応溶液を保持する第 2 のフィルタを下部に有する第 2 の領域が複数形成される第 2 の部材と、疏水性の第 3 のフィルタを有する第 3 の領域が複数形成される第 3 の部材と、前記 P C R 増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第 1 の部材、前記第 2 の部材、前記第 3 の部材の順に配置され、前記第 1 の領域、前記第 2 の領域、前記第 3 の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置と、前記各試料調製ユニットの前記第 2 のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記 P C R 増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記 P C R 増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記第 2 のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有する遺伝子検査装置。

(C 9) 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第 1 の開口と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第 1 のフィルタとを有する第 1 の領域が複数形成される第 1 の部材と、上部に第 2 の開口を有し前記第 1 の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識された P C R 用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させる P C R 増幅反応のための試薬を含む P

PCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、貫通孔が形成される第4の領域を複数有する透明な第4の部材と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して構成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザー光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有する遺伝子検査装置。

(C10) 第1の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2の開口とが対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して構成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザー光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有する遺伝子検査装置。

タとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにはほぼ垂直な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にはほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにはほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有する遺伝子検査装置。

(C11) 第1の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、第2の貫通孔と上部に第2の開口を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材と、前記PCR増幅反応試薬の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにはほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標

識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有する遺伝子検査装置。

(C12) 上部に形成された第1の開口と、下部に形成された第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し下部に第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって、(1)前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、(2)前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を、前記第1の開口に注入して、前記PCR増幅反応溶液を前記第2のフィルタに保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、(5)前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有する遺伝子検査方法。

(C13) 上部に形成された第1の開口と、下部に形成された第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し下部に第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部

1 1

材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、貫通孔を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有し、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向する試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって、(1)前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、(2)前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)前記第1の開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、(5)前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有する遺伝子検査方法。

(C14)第1の貫通孔と、上部に形成された第1の開口と、前記第1の開口の下部に形成された第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し下部に第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有し、前記

1 2

第1の貫通孔と前記第2の開口とが対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成される試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって（1）前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、（2）前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、（3）前記第1の開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を保持して、前記コピーを増幅させる工程と、（4）前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、（5）前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有する遺伝子検査方法。

（C15）第1の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、第2の貫通孔と上部に第2の開口を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に

1 3

配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有し、前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成される試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって、(1)前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、(2)前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)前記第1の開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザー光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、(5)前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有する遺伝子検査方法。

(C16)細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部に形成された第1の開口と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疎水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御

1 4

する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C 1 7) 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疎水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、貫通孔が形成される第4の領域を複数有し透明な第4の部材と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向し、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C 1 8) 第1の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、上部に第2の開口を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疎水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第

1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2の開口とが対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C19) 第1の貫通孔と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材と、前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材と、第2の貫通孔と上部に第2の開口を有する透明な第4の領域が複数形成される第4の部材と、前記PCR増幅反応試薬の温度を制御する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置。

(C20) 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、前記細胞を捕捉する第1のフィルタと、前記上部開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応の

ための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタと、疏水性の第3のフィルタとを有する試料調製ユニットと、前記試料調製ユニットを保持する保持手段と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段とを具備する試料調製装置。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の第1の実施例の試料調製装置の構成例を示す斜視図である。

第2図は、本発明の第1図に於けるA-A'断面を示す断面図である。

第3図は、本発明の第1の実施例の試料調製装置を用いた全血試料の精製方法の工程を説明する断面図である。

第4図は、本発明の第1の実施例で使用する蛍光共鳴エネルギー転移の原理を示す図である。

第5図は、本発明の第1の実施例に於いて、光ファイバーを用いて目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。

第6図は、本発明の第5図の構成例に於いて、刃状の先端を持つ鞘で覆われた光ファイバーを用いる遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。

第7図は、本発明の第1の実施例に於いて、試料調製ユニットの下方向からレーザーを照射し、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。

第8図は、本発明の第1の実施例に於いて、試料調製ユニットの横方向からレーザーを照射し、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。

第9図は、本発明の第2の実施例に於いて、複数の試料調製ユニットを持つ試料調製装置の構成例を示す斜視図である。

第10図は、本発明の第2の実施例に於いて、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。

第11図は、本発明の第2の実施例に於いて、複数の試料調製ユニットを横方向からレーザーを照射し、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す斜視図である。

第12図は、本発明の第2の実施例遺伝子診断装置に用いる2次元走査を行なうレーザー照射及び蛍光検出系の構成例を示す断面図である。

第13図は、本発明の第2の実施例の遺伝子診断装置に用いる1次元走査を行なうレーザー照射及び蛍光検出系の構成例を示す断面図である。

第14図は、本発明の第3の実施例に於ける、試料調製ユニットの構成例を示す斜視図である。

第15図は、本発明の第4の実施例に於いて、カセットタイプの試料調製装置を用いた、複数検体に関する全血試料の精製方法及び目的遺伝子の増幅産物を検出する工程を示す図である。

第16図は、本発明の第5の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理する試料調製ユニットを持つ試料調製装置の構成例を示す斜視図である。

第17図は、本発明の第16図に於けるA-A'断面を示す断面図である。

第18図は、本発明の第5の実施例の試料調製装置を構成する各層の構造を示す図である。

第19図は、本発明の第6の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理する試料調製装置の構成例を示す斜視図である。

第20図は、本発明の第19図に於けるA-A'断面を示す断面図である。

第21図は、本発明の第6の実施例の試料調製装置を構成する各層の構造を示す図である。

第22図は、本発明の第6の実施例の試料調製装置の変形構成例を示す斜視図である。

第23図は、本発明の第7の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理する試料調製装置の構成例を示す斜視図である。

第24図は、本発明の第23図に於けるA-A'断面を示す断面図である。

第25図は、本発明の第7の実施例の試料調製装置を構成する各層の構造を

示す図である。

第26図は、本発明の第8の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理する試料調製装置の構成例を示す平面図である。

第27図は、本発明の第8の実施例の試料調製装置の構成例を示す断面図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を図を参照して詳細に説明する。

(第1の実施例)

〈検体血液の前処理〉

肺癌の患者又は癌検診の受診者より全血の採血を行なう。採血量は1mL(ミリリットル)程度で十分であり、採血された全血はクエン酸ナトリウムにより抗凝固処理を施す。

〈検体血液からのtotal RNAの精製〉

第1図は、本発明の実施例の試料調製装置の構成例を示す斜視図、第2図は、本発明の第1図に於けるA-A'断面を示す断面図である。第1図、第2図に示すように、試料調製装置50は、試料調製ユニット100、試料調製ユニット100を保持する保持部材200、ヒートブロック210から構成される。試料調製ユニット100は、回転対称軸を持ち、大きな第1の半径を持つ上部中空円筒部と、小さな第2の半径を持つ下部中空円筒部と、ボトルネック部から構成される。試料調製ユニットの上部中空円筒部及びボトルネック部は、保持部材200に形成された中空部に収納される。試料調製ユニットの下部中空円筒部は、ヒートブロック210に形成された中空部に収納される。なお、第1図に示す試料調製ユニットでは、第1のフィルタ110を支持するフィルタ支持体120、第2のフィルタ130、第3のフィルタ140を支持するフィルタ支持体150は省略している。

試料調製ユニット100は、細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、上部開口から下部開

口の方向に流路にそれぞれ順次配置される、白血球等の目的とする細胞を捕捉する第1のフィルタ（細胞捕捉用フィルタ）110と、上部開口から注入された変性剤により細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含みポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタ（ポリヌクレオチド捕捉用フィルタ）130と、疏水性の第3のフィルタ（PCR増幅反応溶液を保持する液保持フィルタ）140とから構成される。

白血球等の目的とする細胞を捕捉するために、第1のフィルタの厚さを0.05mmから0.5mmとし、孔径は1 μ mから3 μ mとする。細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、PCR増幅反応溶液を保持するために、第2のフィルタの厚さを0.1mmから0.5mmとし、孔径は10 μ mから40 μ mとする。PCR増幅反応溶液を保持するために、第3のフィルタの厚さを0.1mmから0.5mmとし、孔径は10 μ mから40 μ mとする。第1のフィルタ110は、フィルタ支持体120により、第2のフィルタ130、第3のフィルタ140は、プラスチック等からなるフィルタ支持体150により、それぞれ支持されている。フィルタ支持体120、140は、試料調製ユニットの上部から注がれた液の流路を一定に保ち、第1、第2、及び第3のフィルタに圧力がかかった時に、第1、第2、及び第3のフィルタの破損を防止する。

第1のフィルタ110及びフィルタ支持体120は、試料調製ユニットの上部中空円筒部に配置され、第2のフィルタ130、第3のフィルタ140、及びフィルタ支持体150は、試料調製ユニットの下部中空円筒部に配置される。ヒートブロック210には、試料調製ユニットの下部中空円筒部に配置される第2のフィルタ130の中、及び第2のフィルタ130の上部空間に保持される溶液の温度を昇温、降温させるペルチェ素子が埋め込まれている。

第1図、第2図に示す試料調製装置50のx、y、z方向での寸法はそれ

20

それ、例えば、25mm, 25mm, 60mmであり、保持部材200, ヒートブロック210のz方向での寸法はそれぞれ、50mm, 10mmである。試料調製ユニット100の上部中空円筒部の外径、内径はそれぞれ、例えば、20mm, 18mmであり、下部中空円筒部の外径、内径はそれぞれ、例えば、10mm, 8mmである。

第3図は、本発明の実施例の試料調製装置を用いた全血試料の精製方法の工程を示す断面図である。第3図では、簡単のために試料調製ユニット100を保持する保持部材200, 第3のフィルタ140, ヒートブロック210 (step-6を除く)を省略している。収集された全血中の赤血球を浸透圧により破壊するため、血液サンプル1mLに対し、9mLの50mMのNaCl溶液を加え攪拌する。攪拌後直ちに、破壊された赤血球を含む溶液300の10mLを、試料調製ユニット100の第1のフィルタ110の上部空間に注ぐ(step-1)。

重力により、溶液300は第1のフィルタ110を通過し第1のフィルタ110の下部空間へと流れ落ちるが、溶液300の大半は重力だけでは第1のフィルタ110を通過しない。そこで試料調製ユニット100の上方向から圧力を加えて、溶液300を、第1のフィルタ110を通過させる。この時、溶液300中の白血球302のみが第1のフィルタ110に捕捉される。第1のフィルタ110を通過した溶液は、第1のフィルタ110の下部空間、第2のフィルタ130, 第3のフィルタ140を通過し、廃液タンクへ流れ出る。溶液の第1, 第2, 及び第3のフィルタの通過のために、圧力を加える操作に代えて、遠心力の発生させる操作、下部開口からの吸引操作等も利用できる。続いて、3mLの変性剤310を第1のフィルタ110の上部空間に注ぐ(step-2)。

step-1と同様に、試料調製ユニット100の上方向から圧力を加え、変性剤310を、第1のフィルタ110を通過させる。この時、第1のフィルタ110に捕捉された白血球302の膜が破壊され、RNA320以外の成分304が、第1のフィルタ110に残り、白血球302から出たRNA3

21

20は、第1のフィルタ110の下部空間を通過して、第2のフィルタ130に捕捉される。変性剤310は第3のフィルタ140を通過し、廃液タンクへと流れ出る。第2のフィルタ130は、十分にRNAを保持できるように、厚めのものを使用する。例えば、第2のフィルタ130の厚さを、1mmとする。以上の様にして、採血された全血中より、total RNA 320のみを第2のフィルタ130に捕捉できる(step-3)。

<total RNAから目的遺伝子を増幅>

採血された全血中から精製されたtotal RNAを用いて、診断のための目的遺伝子のPCR増幅を行なう。この遺伝子の増幅産物の有無、又は産物の増幅量に応じて、受診者の癌転移の有無、又は進行具合の診断を実行できる。PCR用の緩衝溶液、目的遺伝子を増幅するための2種類のプライマー、及び4種類のデオキシヌクレオチドを含むPCR増幅反応溶液を予め用意する。50 μ LのPCR増幅反応溶液340を第1のフィルタ110の上部空間に注ぐ(step-4)。

続いて、試料調製ユニット100の上方向から圧力をかける。この時、かける圧力を弱めにし、PCR増幅反応溶液340が第1のフィルタ110は通過するが、第2のフィルタ130は通過しない程度に、かける圧力を調整する。このかける圧力の調整により、PCR増幅反応溶液340が、第2のフィルタ130に染みわたった状態で保持され、第2のフィルタ130中に保持しきれない過剰のPCR増幅反応溶液とtotal RNA 320とが混合した溶液330は、第1のフィルタの下部の、第2のフィルタ130の上部空間に保持される。total RNA 320を含む溶液330は、疎水性の第3のフィルタ140により、試料調製ユニットの外部に漏れ出すことはない(step-5)。

PCRに於ける、第2のフィルタ130の中、及び第2のフィルタ130の上部空間に保持される溶液の温度の昇温、降温の制御は、ヒートブロック210により実行される。第2のフィルタ130、及び第3のフィルタ140の上部空間に保持された溶液330中に於いて、目的遺伝子のPCR増幅

2 2

が実行されPCR増幅産物335を含む溶液が得られる(step-6)。

〈PCR産物のリアルタイム検出〉

PCR増幅産物のリアルタイム検出の第1の方法では、新たに合成(増幅)された2本鎖DNAに優先的に結合し、その結合により蛍光強度が大きく増強されるような蛍光体を、PCR増幅反応溶液340に予め混合しておく。蛍光体として、例えば、SYBRグリーンI(Molecular Probe社)を用いる。SYBRグリーンIは、新たに合成(増幅)された2本鎖DNAに結合するので、蛍光強度とDNA濃度は正比例し、PCR増幅産物が定量的に検出できる。PCR増幅反応を行ないながら、蛍光強度を検出することにより、PCR産物の増幅過程がリアルタイムでモニタできる。

PCR増幅産物のリアルタイム検出の第2の方法では、蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence Resonance Energy Transfer:FRET)の原理を利用する。

第4図は、本発明の実施例で使用する蛍光共鳴エネルギー転移の原理を示す図である。FRETは、2つのプローブが近接して増幅産物にハイブリダイズした場合にのみ起こる。変性により1本鎖状態になった鋳型DNA21に、3'末端にドナー色素(F1)22が標識されたハイブリダイゼーションプローブ23がアニーリングし、ハイブリダイゼーションプローブ23に隣接して、5'末端にアクセプター色素(F2)24が標識されたハイブリダイゼーションプローブ25がハイブリダイズする。ドナー色素(F1)22が、LED(Light-Emitting Diode:発光ダイオード)からの光26によって励起され、ドナー色素(F1)22は、アクセプター色素(F2)24を励起する波長の光を発する。アクセプター色素(F2)24は2次励起により、より長い波長の光27を放射する。

ハイブリダイゼーションプローブ23、25が互いに隣接してハイブリダイズする特異的なDNAが存在しない場合には、FRET現象を起こさない。PCR産物の増加に伴い、変性により1本鎖状態になった鋳型DNAにハイブリダイズするプローブの量は増加する。FRETによる光27の強度は、

23

ハイブリダイゼーションプローブ23, 25が互いに隣接してハイブリダイズする特異的なDNAのPCR産物の量に比例する。FRETによる光27を検出することにより、PCR産物の増幅過程がリアルタイムでモニタできる。

第5図は、本発明の第1の実施例に於いて、光ファイバーを用いて目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。光ファイバー31を試料調製ユニット100の上部から挿入し、第1のフィルタ110の中心部に圧力をかけフィルタを破り穴を開けファイバー31を通し、第2のフィルタ130の上部に保持されるPCR増幅産物335を含む溶液の液面のすれすれの位置まで、光ファイバー31を進める。次に、光源370から発するレーザー380を、ダイクロイックミラー385で反射させ、ファイバー31を通して、PCR増幅産物335を含む溶液に照射する。レーザー380によりPCR増幅産物を標識する蛍光体から蛍光が発生し、ダイクロイックミラー385を透過した蛍光は、CCDカメラ400により検出される。

第6図は、本発明の第5図の構成例に於いて、刃状の先端を持つ鞘で覆われた光ファイバーを用いる遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。外径100 μ mの光ファイバー31は、外径140 μ m、内径120 μ mを持つ鞘42の中空円筒の内部に配置されており、鞘42の先端部は、中空円筒の軸に交叉する面で切削されて、刃状の先端41が形成されている。第6図に示す構成例では、第5図に示す光ファイバー31を刃状の先端41を持つ鞘42で覆う構成以外は、第5図に示す構成例と同じである。第1のフィルタ110の中心部に鞘42でフィルタを破り穴を開け、PCR増幅産物335を含む溶液の液面の上部まで鞘42を通す。この状態で、鞘42の内部から、光ファイバー31を鞘42の外部へ突き出し、ファイバー31をPCR増幅産物335を含む溶液の液面のすれすれの位置まで近づける。レーザーの照射により生じる蛍光の検出は、第5図と同様に行なう。

光ファイバーを使用しないで、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検

出すこともできる。

第7図は、本発明の第1の実施例に於いて、試料調製ユニットの下方方向からレーザーを照射し、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。試料調製ユニット100の下方方向からレーザー380を入射し、第3のフィルタ140を透過したレーザー380が、第2のフィルタ130に保持されているPCR増幅産物335を含む溶液に照射され、PCR増幅産物を標識する蛍光体からの蛍光395は、試料調製ユニットの下部開口の下方に配置される光電増倍管390によりリアルタイムで検出できる。

第8図は、本発明の第1の実施例に於いて、試料調製ユニットの横方向からレーザーを照射し、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。第8図に示す構成例では、試料調製ユニット100を保持する保持部材200”は透明な材質で構成され、レーザー380が、第2のフィルタ130の上部に保持されているPCR増幅産物335を含む溶液に照射される。保持部材200”を不透明な材質で構成する場合には、レーザー380が通過する孔を開ける構成としても良い。第7図の場合と同様に、PCR増幅産物を標識する蛍光体からの蛍光395は、試料調製ユニットの下部開口の下方に配置される光電増倍管390によりリアルタイムで検出できる。なお、レーザが照射される試料調製ユニット100の部分は透明な材質から構成されている。

第7図、第8図に於いて、第2のフィルタ130、第3のフィルタ140は透明であることが望ましい。第2のフィルタ130、第3のフィルタ140が透明でない場合でも、第3のフィルタ140の孔を通過したレーザー380が、第2のフィルタ130の孔を通過し、PCR増幅産物335を含む溶液に照射され、PCR増幅産物を標識する蛍光体からの蛍光395が、第2のフィルタ130の孔、及び第3のフィルタ140の孔を通過して、蛍光が光電増倍管390に到達するので、容易に蛍光検出がリアルタイムでできる。

25

リアルタイムでPCR産物を検出するのでなく、PCR増幅終了後に産物を検出しても良い。試料調製ユニットの上方向より圧力を加え、PCR増幅が終了した溶液を、試料調製ユニットの下部開口に配置した回収容器に回収する。回収容器にレーザーを照射して、PCR増幅産物を標識する蛍光体からの蛍光を検出して、PCR増幅産物の定量ができる。

以上説明したように、診断のための目的遺伝子のPCR増幅過程をリアルタイムに定量的に分析すること、又はPCR増幅反応終了後に増幅産物を定量することにより、肺癌等の転移の有無、又は、転移の進行等の診断に応用できる。

(第2の実施例)

第9図は、本発明の第2の実施例に於いて、複数の試料調製ユニットを持つ試料調製装置の構成例を示す斜視図である。第9図に示す試料調製装置50'は、第1図、第2に示す試料調製ユニット50を、交叉する2方向に複数個(第9図では、簡単のため9個の例を示す)一体化する構成である。試料調製装置50'は、複数の試料調製ユニット100を保持する保持部材200'、ヒートブロック210'から構成される。各試料調製ユニット100の上部中空円筒部及びボトルネック部は、保持部材200'に形成された中空部に収納される。各試料調製ユニットの下部中空円筒部は、ヒートブロック210'に形成された中空部に収納される。第1図、第2に示す試料調製ユニット50を、x方向、及びy方向にそれぞれ10個もつ試料調製装置50'の大きさは250mm×250mmである。

第9図に示す試料調製装置50'では、第1の実施例で説明した1検体に関して行なう、検体の血液からのtotal RNAの精製、total RNAから目的遺伝子を増幅、PCR産物のリアルタイム検出の各処理を、複数の検体に関して一括して同時に処理できる。

検体血液からのtotal RNAの精製は、第1の実施例と同様にして、各試料調製ユニット100で独立して、各検体血液からのtotal RNAの精製の操作を、並行して同時に行なう。total RNAから目的遺

26

伝子を増幅も、第1の実施例と同様にして、各試料調製ユニット100の第2のフィルタ130及び第3のフィルタ140の上部に保持された液中で、目的遺伝子のPCR増幅を行なう。

第10図は、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す断面図である。第5図、又は第6図と同様の構成により、試料調製ユニットの上部から各光ファイバー91を、第2のフィルタ130に保持されるPCR増幅産物335を含む溶液に接触させる。光源370からのレーザー380をPCR増幅産物335を含む溶液に照射する。レーザー380は、ダイクロイックミラー385のアレーからなるビームスプリッターにより各光ファイバー91に入射される。PCR増幅産物335を含む溶液から発生する蛍光は、ダイクロイックミラー385を介し、集光レンズ96により集光されCCDカメラ400により検出される。第10に示すレーザー380は、第9図に示すy方向の3行の1行毎に並ぶ3個の各試料調製ユニットに同時に照射され、y方向の1行毎の各試料調製ユニットからの蛍光がリアルタイムで同時に検出される。

第11図は、本発明の第2の実施例に於いて、試料調製装置50”の複数の試料調製ユニットを横方向からレーザーを照射し、目的遺伝子の増幅過程をリアルタイムで検出する遺伝子検出装置の構成例を示す斜視図である。第8図に示す構成例と同様に、試料調製ユニット100を保持する保持部材200”は透明な材質で構成される。保持部材200”を不透明な材質で構成する場合には、レーザー380が通過する孔を開ける構成としても良い。なお、レーザーが照射される試料調製ユニット100の部分は透明な材質から構成されている。

レーザー380は、ダイクロイックミラー385により、y軸に平行な3行の各行に配列する試料調製ユニット100の3個に同時に照射され、各試料調製ユニット100の第2のフィルタ130の上部に保持されているPCR増幅産物335を含む溶液に照射される。各試料調製ユニット100に於いて、PCR増幅産物を標識する蛍光体からの蛍光395は、試料調製装置50”

の下部開口の下方に配置されるCCDカメラ400でリアルタイムで検出される。CCDカメラ400を配置して、蛍光395を試料調製装置50”の上部開口から検出しても良い。

第11図に於いて、各試料調製ユニット100の第2のフィルタ130、第3のフィルタ140は透明であることが望ましい。第2のフィルタ130、第3のフィルタ140が透明でない場合でも、第3のフィルタ140の孔を通過したレーザー380が、第2のフィルタ130の孔を通過し、PCR増幅産物335を含む溶液に照射され、PCR増幅産物を標識する蛍光体からの蛍光395が、第2のフィルタ130の孔、及び第3のフィルタ140の孔を通過して、蛍光が光電増倍管390に到達するので、容易に蛍光検出がリアルタイムでできる。

第11図に示す試料調製装置50’では、同時に複数の試料調製ユニットを同時にレーザ照射できるので、複数の試料調製ユニットに於いて、診断のための目的遺伝子のPCR増幅過程をリアルタイムに同時に分析できる。

第11図に示す光源370を含むレーザ照射系、蛍光検出するCCDカメラ400に代えて、第12図に示すレーザ照射及び蛍光検出系をx方向、及びy方向に2次元走査、または、第13図に示すレーザ照射及び蛍光検出系をx方向又はy方向に1次元走査して、各試料調製ユニットの上部開口からレーザを照射して、蛍光を各試料調製ユニットの上部開口から検出して良い。第13図に示す複数の光電増倍管390をCCDカメラ400に代えても良いことは言うまでもない。

以上説明したように、診断のための目的遺伝子のPCR増幅過程を、複数の検体に関してリアルタイムに定量的に分析し、複数の検体に関する肺癌等の転移の有無、又は、転移の進行等の診断に応用できる。

(第3の実施例)

第1の実施例、第2の実施例で説明した試料調製ユニット100に代えて、第14図に示す試料調製ユニット100’を用いることもできる。試料調製ユニット100’は、回転対称軸を持ち、大きな辺を持つ正方形の断面を持つ

28

上部中空筒部と、小さな辺を持つ正方形の断面を持つ下部中空筒と、上部中空筒部と下部中空筒部とを結ぶネック部から構成される。試料調製ユニットの上部中空筒部及びネック部は、保持部材に形成された中空部に収納される。試料調製ユニットの下部中空筒部は、ヒートブロックに形成された中空部に収納される。試料調製ユニット100'の高さは、試料調製ユニット100の高さと同じであり、上部中空筒部、下部中空筒部の断面積はそれぞれ、例えば、16mm×16mm、5mm×5mmである。

(第4の実施例)

検体血液の前処理は、第1の実施例と同様の操作で行なう。

〈検体血液からのtotal RNAの精製〉

第15図は、本発明の第4の実施例に於いて、カセットタイプの試料調製装置を用いた、複数検体に関する全血試料の精製方法及び目的遺伝子の増幅産物を検出する工程を示す図である。収集された各検体毎の血液サンプル1mLに対し、9mLの50mM NaCl溶液を加え攪拌する。攪拌後直ちに各検体に関する溶液を、第1のフィルタ110、及び第1のフィルタを支持するフィルタ支持体120が底部に装着されている複数のウエルが形成された第1のカセット800の別々のウエルに注ぐ。各ウエル毎に別検体の調製がなされる。第1のカセット800の上方向からガス圧力をかけ、または、第1のカセット800の下方向から吸引して、溶液中の白血球のみを第1のフィルタに捕捉する。

続いて、第1のカセット800のウエルに対応して形成されたウエルの底部に、第2のフィルタ、第3のフィルタ、及び、第2、第3のフィルタを支持するフィルタ支持体150（図示せず）が装着された第2のカセット810を、第1のカセット800の下へセットする。次に、第1のカセット800に変性剤を注ぐ。第1のカセット800の上方向からガス圧力をかけ、または、第2のカセット810の下方向から吸引して、変性剤を、第1、第2のフィルタを通過させ、各検体から採血された全血中より、各検体毎に独立して、total RNAのみを第2のカセット810の別々のウエルの第

29

2のフィルタ130に捕捉する。

〈total RNAから目的遺伝子を増幅〉

精製されたtotal RNAを用いて、診断のための目的遺伝子の増幅を行なう。PCR用兼増幅産物検出用の第3のカセット820が下部に装着された第2のカセット810の各ウエルに、PCR増幅反応溶液を注いだ後に、第2のカセット800の上方向からガス圧力をかけ、または、第3のカセット820の下方向から吸引すると、第2のカセット810の第2のフィルタ130に捕獲されたRNAが、第2のフィルタ130をPCR増幅反応溶液が通過する時に、PCR増幅反応溶液に溶出して、第3のカセット820の各ウエルに移動する。続いて、第3のカセット820のみをヒートブロック210'（第15図には図示せず）にセットし、目的遺伝子のPCRを行なう。

〈PCR産物の検出〉

PCR終了後、第12図又は第13図に示すレーザー照射及び蛍光検出系を用いて、第3のカセット820の各ウエルにレーザを照射して第3のカセット820の各ウエル毎で目的遺伝子の増幅産物の検出及び定量を行なう。
（第5の実施例）

第16図は、本発明の第5の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理する試料調製ユニットを持つ試料調製装置の構成例を示す斜視図、第17図は、第16図に於けるA-A'断面を示す断面図、第18図は、第5の実施例の試料調製装置を構成する各層の構造を示す図である。第16図から第18図に示す構成に於いて、試料調製ユニットを1個持つ試料調製装置の構成としても良いことは言うまでもない。

第5の実施例の試料調製装置550-1は、第1の基板500、第2の基板520、第3の基板530、及び、第4の基板540から構成される。試料調製装置550-1では、複数の試料調製ユニットが2次元に一体化して形成され、各試料調製ユニットで異なる検体の試料調製が実行される。

第1の基板500には、破壊された赤血球を含む溶液（各検体について第

30

1の実施例と同様の操作で得られる)が検体毎に別々に注入される複数の上部開口511-1, 512-1, 513-1, 514-1と, 各開口の底部に第1のフィルタとが形成される。第2の基板520には, 上部開口511-1, 512-1, 513-1, 514-1に対向する上部開口511-2, 512-2, 513-2, 514-2と, 各開口の底部に第2のフィルタとが形成される。第3の基板530には, 上部開口511-2, 512-2, 513-2, 514-2の各開口の底部の第2のフィルタに対向して上部に第3のフィルタが形成され, 各第3のフィルタの下部に下部開口511-3, 512-3, 513-3, 514-3が形成される。第4の基板540には, 下部開口511-3, 512-3, 513-3, 514-3に対向して, 貫通孔511-4, 512-4, 513-4, 514-4が形成されている。また, 第4の基板540には, 各第2のフィルタの中, 及び各第2のフィルタの上部空間に保持される溶液の温度を昇温, 降温させPCR増幅に於ける温度制御行なうペルチェ素子が埋め込まれている。

第1から第4の基板は, シリコンの液相, 又は気相エッチングによる加工により得られる。例えば, 第1の基板の厚さは $500\mu\text{m}$ であり, 第1のフィルタの厚さは $1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$, 第1のフィルタは断面積が $(1\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})\times(1\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})$ の正方形の複数の孔を持ち, 第2の基板の厚さは $500\mu\text{m}$ であり, 第2のフィルタの厚さは $10\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$, 第2のフィルタは断面で大きさが約 $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ の正方形の複数の孔を持ち, 第3の基板の厚さは $500\mu\text{m}$ であり, 第3のフィルタの厚さは $10\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$, 第3のフィルタは表面が疎水性加工され, 断面積が $(2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})\times(2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})$ の正方形の複数の孔を持つ。第1, 第2, 第3の基板の開口の底部の面積はそれぞれ, $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$, $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$, $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ であり, 第4の基板の貫通孔の断面積は $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ である。第1, 第2, 第3, 及び第4の基板は, 順次積層されて一体化される。x方向, 及びy方向にそれぞれ20個の試料調製ユニットが構成される試料調製装置550-1の大きさは, 20

mm×20mmである。

検体血液からのtotal RNAの精製，total RNAから目的遺伝子を増幅は，第1の実施例と同様の操作で行なう。各第2のフィルタの中，及び各第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液571，572，573，574に，第12図に示すレーザー照射及び蛍光検出系をx方向，及びy方向に2次元走査するか，または，第13図に示すレーザー照射及び蛍光検出系をx方向又はy方向に1次元走査して，第17図に示すようにレーザ380を照射して，PCR増幅産物を含む溶液から発生する蛍光を，レーザ380を照射した方向から検出する。また，第1の基板の各開口から第2のフィルタの中，及び第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液に，レーザ380を照射し，第4の基板の開口から蛍光を検出しても良いし，逆に，第4の基板の各開口からレーザ380を照射し，第1の基板の開口から蛍光を検出しても良い。更に，第5図，第6図，又は第10図に示す構成と同様にして，第1のフィルタに孔を開けて，光ファイバーを第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液にすれすれの位置まで近接させて，レーザを照射して蛍光をリアルタイムに検出しても良い。

(第6の実施例)

第19図は，本発明の第6の実施例に於いて，複数の検体を同時に処理する試料調製装置の構成例を示す斜視図，第20図は，第19図に於けるA-A'断面を示す断面図，第21図は，第6の実施例の試料調製装置を構成する各層の構造を示す図である。第19図から第21図に示す構成に於いて，試料調製ユニットを1個持つ試料調製装置の構成としても良いことは言うまでもない。

第5の実施例と同様に，試料調製装置550-2では，複数の試料調製ユニットが2次元に一体化して形成され，各試料調製ユニットで異なる検体の試料調製が実行される。第6の実施例の試料調製装置550-2の構成では，第5の実施例の試料調製装置550-1の構成に於いて，第1の基板500-

3 2

と第2の基板520との間に、透明な第5の基板510を配置している。第5の基板510は、第1の基板500の第1のフィルタ、及び第2の基板の上部開口511-2, 512-2, 513-2, 514-2に対向する貫通孔511-5, 512-5, 513-5, 514-5を持つ。第5の基板510の厚さは500 μ mであり、貫通孔の断面積は500 μ m \times 500 μ mである。

検体血液からのtotal RNAの精製, total RNAから目的遺伝子を増幅は、第1の実施例と同様の操作で行なう。第11図に示すレーザ照射系を用いて、第20図に示すように第5の基板510の側方から(y方向から)にレーザ380を、各第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液571, 572, 573, 574に照射して、第11図に示す構成と同様にして、試料調製装置550-2の下方からCCDカメラ400により第3, 第4の開口を通して蛍光395を検出する。試料調製装置550-2の上方からCCDカメラ400により第1の開口を通して蛍光395を検出しても良い。

第22図は、本発明の第6の実施例の試料調製装置の変形構成例を示す斜視図である。第22図に示す試料調製装置550-3の構成では、複数の試料調製ユニットが1次元に一体化して形成され、各試料調製ユニットで異なる検体の試料調製が実行される。第22図に示すように第5の基板510の側方から(x方向から)レーザ380を、各第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液571, 572, 573, 574に照射して、レーザの照射方向と交叉する、第5の基板510の側方から(y方向から)蛍光395をCCDカメラ400により検出する。蛍光395を試料調製装置550-3の上方又は下方から検出しても良い。第22図に示す構成に於いて、試料調製ユニットを1個持つ試料調製装置の構成としても良いことは言うまでもない。

(第7の実施例)

第23図は、本発明の第7の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理す

3 3

る試料調製装置の構成例を示す斜視図、第24図は、第23図に於けるA-A'断面を示す断面図、第25図は、第7の実施例の試料調製装置を構成する各層の構造を示す図である。第23図から第25図に示す構成に於いて、試料調製ユニットを1個持つ試料調製装置の構成としても良いことは言うまでもない。

第7の実施例の試料調製装置650-1は、第1の基板600、第2の基板620、第3の基板630、及び、第4の基板640から構成される。試料調製装置650-1では、複数の試料調製ユニットが2次元に一体化して形成され、各試料調製ユニットで異なる検体の試料調製が実行される。

第1の基板600には、破壊された赤血球を含む溶液（各検体について第1の実施例と同様の操作で得られる）が検体毎に別々に注入される複数の上部開口611-1、612-1、613-1、614-1と、各開口の底部に第1のフィルタとが形成される。第1の基板600には、開口611-1、612-1、613-1、614-1にそれぞれ近接して貫通孔601、602、603、604が形成されている。第2の基板620には、第1の基板の上部開口611-1、612-1、613-1、614-1に対向する上部開口611-2、612-2、613-2、614-2と、第1の基板の貫通孔601、602、603、604にそれぞれ対向して、第1の上部開口611-2、612-2、613-2、614-2に接続し底部に第2のフィルタを持つ第2の上部開口611'-2、612'-2、613'-2、614'-2とが形成されている。第2の上部開口の深さは、第1の上部開口の深さよりも深い。第3の基板630には、上部開口611'-2、612'-2、613'-2、614'-2の各開口の底部の第2のフィルタに対向して、上部に第3のフィルタが形成され、各第3のフィルタの下部に下部開口611-3、612-3、613-3、614-3が形成される。第4の基板640には、下部開口611-3、612-3、613-3、614-3に対向して、貫通孔611-4、612-4、613-4、614-4が形成されている。また、第4の基板には、各第2のフィルタの中、及

34

び各第2のフィルタの上部空間に保持される溶液の温度を昇温、降温させPCR増幅に於ける温度制御行なうペルチェ素子が埋め込まれている。

第1から第4の基板は、シリコンの液相、又は気相エッチングによる加工により得られる。例えば、第1の基板の厚さは $500\mu\text{m}$ であり、第1のフィルタの厚さは $1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 、第1のフィルタは断面積が $(1\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})\times(1\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})$ の正方形の複数の孔を持ち、第2の基板の厚さは $500\mu\text{m}$ であり、第2のフィルタの厚さは $10\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 、第2のフィルタは断面積が約 $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$ の正方形の複数の孔を持ち、第3の基板の厚さは $500\mu\text{m}$ であり、第3のフィルタの厚さは $10\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 、第3のフィルタは表面が疎水性加工され、断面積が $(2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})\times(2\mu\text{m}\sim 3\mu\text{m})$ の正方形の複数の孔を持つ。第1の基板の開口の底部の面積は $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ であり、第1の基板の貫通孔の断面積は $500\mu\text{m}\times 500\mu\text{m}$ である。x方向、及びy方向にそれぞれ20個の試料調製ユニットが構成される試料調製装置650-1の大きさは、 $20\text{mm}\times 20\text{mm}$ である。

検体血液からのtotal RNAの精製、total RNAから目的遺伝子を増幅は、第1の実施例と同様の操作で行なう。第12図又は第13図に示すレーザー照射及び蛍光検出系を用いて、第1の基板の貫通孔601、602、603、604を通してレーザーを、各第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液571、572、573、574に照射して、蛍光を検出する。第11図に示すレーザー照射系を用いて、レーザーを貫通孔601、602、603、604を通してレーザーをPCR増幅産物を含む溶液に照射して、蛍光を第4の基板の貫通孔を通してCCDカメラ400により検出しても良い。

第7の実施例の試料調製装置650-1では、第1のフィルタと第2のフィルタとが対向していないこと、第2のフィルタの上部の開口の底部の面積が小さく、深さが深く、PCR増幅産物を含む溶液が微小体積に収納され、レーザーをPCR増幅産物を含む溶液に直接照射して蛍光を検出するので、蛍

35

光を検出直接に検出でき、高感度で定量的に診断のための目的遺伝子のPCR増幅過程をリアルタイムに同時に分析できる特徴がある。

(第8の実施例)

第26図は、本発明の第8の実施例に於いて、複数の検体を同時に処理する試料調製装置の構成例を示す平面図、第27図は、第8の実施例の試料調製装置の構成例を示す断面図である。第26図、第27図に示す構成に於いて、試料調製ユニットを1個持つ試料調製装置の構成としても良いことは言うまでもない。

第8の実施例の試料調製装置650-2では、第7の実施例の試料調製装置650-1の構成に於いて、第2の基板620を、透明な基板620aと基板620bで構成する。基板620aには、第1の基板の上部開口611-1、612-1、613-1、614-1に対向する第1の上部開口611-2、612-2、613-2、614-2と、第1の基板の貫通孔601、602、603、604にそれぞれ対向して、第1の上部開口611-2、612-2、613-2、614-2に接続する貫通孔611'-2、612'-2、613'-2、614'-2が形成されている。基板602bには、基板602aの貫通孔611'-2、612'-2、613'-2、614'-2に対向して第2のフィルタが形成されている。基板620aと基板620bとを一体化することにより、基板602bの第2のフィルタの上部に第2の上部開口611'-2、612'-2、613'-2、614'-2が形成される。

第26図、及び第27図に示すように、レーザ380を基板620aの側方から照射し、試料調製装置の各試料調製ユニットの第2のフィルタの上部空間に保持されたPCR増幅産物を含む溶液571、572、573、574に照射して、第1の基板の貫通孔を通して、CCDカメラ400により蛍光を検出する。蛍光を第4の基板の貫通孔を通してCCDカメラ400で蛍光を検出しても良い。

第8の実施例の試料調製装置では、同時に複数の試料調製ユニットを同時

36

にレーザ照射でき、PCR増幅産物を含む溶液からの蛍光を直接検出でき、複数の試料調製ユニットに於いて、高感度で定量的に診断のための目的遺伝子のPCR増幅過程をリアルタイムに同時に分析できる特徴がある。

以上説明した第5から第8の実施例では、シリコン基板を使用してフォトリソグラフィ技術、及びエッチング技術により作成できるので、シリコン基板に、第1、第2、及び第3のフィルタの孔径、貫通孔の断面積、開口の深さ、開口の底面積等を、非常に精度良く形成でき、性能の揃った微小な調製ユニットを複数有する試料調製装置を安価に提供できる。また、シリコン基板中に拡散層を形成してヒーター抵抗、温度を検出するpn接合を一体形成できるので、PCR増幅反応の温度サイクルを、外部の温度制御用ヒーターを使用することなく、シリコンチップのみで実行でき、小型の試料調製装置を製作できる。更に、シリコンは熱容量が小さいので、PCR増幅反応に於ける温度サイクルの高速化が可能となる。

試料調製ユニットの1個当たりの占有面積は、例えば、1mm×1mmの面積で十分であり、1インチのシリコン基板を使用して、約300個の試料調製ユニットを持つ試料調製装置が作成可能であり、0.5μL程度の微量の試料を使用する遺伝子検査が可能となる。

以上の説明では、全血中の白血球に由来するRNAを抽出、増幅、及び検出する例をとって説明したが、本発明が適用可能な検査対象の試料は、全血中の白血球に限らず、全血中に混在する各種の臓器に由来する細胞から抽出したRNA、細胞培養液中で培養された細胞から抽出したRNAでも良いことは言うまでもない。

本発明の試料調製装置では、全血を懸濁させた緩衝溶液、細胞培養液中で培養された細胞を懸濁させた緩衝溶液、組織細胞を懸濁させた緩衝溶液等を、第1、第2、及び第3のフィルタを持つ試料調製装置の試料注入開口に注ぎ、次に、細胞を破壊するための試薬、細胞からRNAを溶出させる変性剤、及びPCR増幅反応溶液を順次加えて、total RNAを精製し、total RNAから目的とする遺伝子をPCR増幅し、目的遺伝子の検出まで――

の一連の各操作を連続して行なうので、各操作間でのコンタミネーションを防止でき、多検体の同時処理を容易にできる。

38

請 求 の 範 囲

1. 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、前記細胞を捕捉する第1のフィルタ（110）と、前記上部開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタ（130）と、疏水性の第3のフィルタ（140）とを有する試料調製ユニット（100, 100'）を1又は複数具備し、前記試料調製ユニットを保持する保持手段（200, 200'）と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段（210, 210'）とを具備する試料調製装置（50, 50', 50''）と、前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光（380）を、前記第2のフィルタにほぼ垂直又はほぼ平行な方向から前記PCR増幅反応溶液に照射する照射手段（370, 380, 385, 31）と、前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光（395）を、前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から検出する検出手段（385, 390, 400）とを有することを特徴とする遺伝子検査装置。
2. 請求の範囲第1項記載の遺伝子検査装置に於いて、前記試料調製装置は、直線に沿って配置される前記試料調製ユニットを複数有し、前記照射手段は、前記レーザ光を、前記直線に沿って前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各前記試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射し、前記検出手段は、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出し、前記保持手段の前記レーザ光の照射される部位が、前記レーザ光の波長及び前記蛍光の波長に対して透明な部材（200''）から構成されることを特徴とする遺伝子検査装置。

39

3. 請求の範囲第1項記載の遺伝子検査装置に於いて、前記試料調製装置は、直線に沿って配置される複数の前記試料調製ユニットの列を複数有し、前記照射手段は、前記レーザ光を、前記各列の前記直線に沿って前記各列の前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各列の前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射し、前記検出手段は、前記各列の前記試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光を、前記各列の前記各前記試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出し、前記保持手段の前記レーザ光の照射される部位が、前記レーザ光の波長及び前記蛍光の波長に対して透明な部材(200")から構成されることを特徴とする遺伝子検査装置。

4. 請求の範囲第1項記載の遺伝子検査装置に於いて、前記試料調製装置は、直線に沿って配置される前記試料調製ユニットを複数有し、前記照射手段は、前記レーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射し、前記検出手段は、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出することを特徴とする遺伝子検査装置。

5. 請求の範囲第1項記載の遺伝子検査装置に於いて、前記試料調製装置は、直線に沿って配置される複数の前記試料調製ユニットの列を複数有し、前記照射手段は、前記レーザ光を、前記各列の前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各列の前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射し、前記検出手段は、前記各列の前記試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光を、前記各列の前記各前記試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出することを特徴とする遺伝子検査装置。

40

6. 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、前記細胞を捕捉する第1のフィルタ（110）と、前記上部開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタ（130）と、疎水性の第3のフィルタ（140）とを有することを特徴とする試料調製ユニット。

7. 請求の範囲第6項記載の試料調製ユニットに於いて、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタと間に前記PCR増幅反応溶液を保持する空間を有することを特徴とする試料調製ユニット。

8. 請求の範囲第6項記載の試料調製ユニットに於いて、前記第2のフィルタの面積が前記第1のフィルタの面積よりも小さいことを特徴とする試料調製ユニット。

9. 請求の範囲第6項記載の試料調製ユニットに於いて、前記第2のフィルタが、前記第3のフィルタと接触していることを特徴とする試料調製ユニット。

10. 請求の範囲第6項記載の試料調製ユニットに於いて、前記試料調製ユニットが透明な部材から構成されることを特徴とする試料調製ユニット。

11. 請求の範囲第6項記載の試料調製ユニットに於いて、前記試料調製ユニットが回転対称軸を有することを特徴とする試料調製ユニット。

12. 請求項11に記載の試料調製ユニットに於いて、前記試料調製ユニットの外形が、前記試料調製ユニットの前記回転対称軸に垂直な断面に於いて円、又は正方形であることを特徴とする試料調製ユニット。

13. 上部開口と下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、第1のフィルタ（110）と、第2のフィルタ（130）と、疎水性の第3のフィルタ（140）とを有する試料調製ユニット。

41

有する試料調製ユニット（100，100'）を1又は複数具備する試料調製装置（50，50'，50''）を使用する遺伝子検査方法であって，（1）前記試料調製ユニットの前記上部開口に，細胞を懸濁させた緩衝液を注入して，前記第1のフィルタに前記細胞を捕捉する工程と，（2）前記上部開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出させたポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と，（3）前記上部開口に，蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して，前記PCR増幅反応溶液を前記第2のフィルタに保持して，前記コピーを増幅させる工程と，（4）前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を，前記PCR増幅反応溶液に照射して前記蛍光標識からの蛍光を検出する工程とを有する遺伝子検査方法。

14．請求の範囲第13項記載の遺伝子検査方法に於いて，前記レーザ光が，前記第2のフィルタにほぼ垂直又はほぼ平行な方向から前記PCR増幅反応溶液に照射され，前記蛍光が，前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から検出されることを特徴とする遺伝子検査方法。

15．請求の範囲第13項記載の遺伝子検査方法に於いて，前記試料調製装置は，直線に沿って配置される前記試料調製ユニットを複数有し，前記保持手段の前記レーザ光の照射される部位が，前記レーザ光の波長及び前記蛍光の波長に対して透明な部材（200''）から構成され，前記レーザ光が，前記直線に沿って前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から，前記各前記試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射され，前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光が，前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出されることを特徴とする遺伝子検査方法。

16．請求の範囲第13項記載の遺伝子検査方法に於いて，前記試料調製装置は，直線に沿って配置される複数の前記試料調製ユニットの列を複数有

4 2

し、前記保持手段の前記レーザ光の照射される部位が、前記レーザ光の波長及び前記蛍光の波長に対して透明な部材（200"）から構成され、前記レーザ光が、前記各列の前記直線に沿って前記各列の前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各列の前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射され、前記各列の前記試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光が、前記各列の前記各前記試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出されることを特徴とする遺伝子検査方法。

17. 請求の範囲第13項記載の遺伝子検査方法に於いて、前記試料調製装置は、直線に沿って配置される前記試料調製ユニットを複数有し、前記レーザ光が、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射され、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光が、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出されることを特徴とする遺伝子検査方法。

18. 請求の範囲第13項記載の遺伝子検査方法に於いて、前記試料調製装置は、直線に沿って配置される複数の前記試料調製ユニットの列を複数有し、前記レーザ光が、前記各列の前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各列の前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射され、前記各列の前記試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの前記蛍光が、前記各列の前記各前記試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出されることを特徴とする遺伝子検査方法。

19. 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部に形成された第1の開口（511-1, 512-1, 513-1, 514-4; 611-1, 612-1, 613-1, 614-4）と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフ

43

フィルタとを有する第1の部材(500, 600)と、上部に第2の開口(511-2, 512-2, 513-2, 514-2; 611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の部材(520, 620)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の部材(530, 630)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(540, 640)を具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置される複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

20. 請求の範囲第19項記載の試料調製装置に於いて、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材が、シリコン基板から形成され、前記第1のフィルタ、前記第2のフィルタ、前記第2のフィルタの孔が、前記シリコン基板に形成された孔であることを特徴とする試料調製装置。

21. 請求の範囲第19項記載の試料調製装置に於いて、前記第2のフィルタの面積が前記第1のフィルタの面積よりも小さいことを特徴とする試料調製装置。

22. 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(511-1, 512-1, 513-1, 514-4)と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の部材(500)と、上部に第2の開口(511-2, 512-2, 513-2, 514-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の部材(520)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の部材

4 4

(530)と、貫通孔(511-5, 512-5, 513-5, 514-5)を有し透明な第4の部材(510)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(540)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して構成される複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

23. 請求の範囲第22項記載の試料調製装置に於いて、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材が、シリコン基板から形成され、前記第1のフィルタ、前記第2のフィルタ、前記第2のフィルタの孔が、前記シリコン基板に形成された孔であることを特徴とする試料調製装置。

24. 請求の範囲第22項記載の試料調製装置に於いて、前記第2のフィルタの面積が前記第1のフィルタの面積よりも小さいことを特徴とする試料調製装置。

25. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(611-1, 612-1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の部材(600)と、上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の部材(620)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の部材(630)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(640)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2の開口(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)とを有する第1の部材と、前記第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2)とを有する第2の部材と、前記第3の開口(631-3, 632-3, 633-3, 634-3)とを有する第3の部材とを有することを特徴とする試料調製装置。

4 5

－2，6 1 4'－2）とが対向し，前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され，前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成される複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

26．請求の範囲第25項記載の試料調製装置に於いて，前記第1の部材，前記第2の部材，前記第3の部材が，シリコン基板から形成され，前記第1のフィルタ，前記第2のフィルタ，前記第2のフィルタの孔が，前記シリコン基板に形成された孔であることを特徴とする試料調製装置。

27．請求の範囲第25項記載の試料調製装置に於いて，前記第2のフィルタの面積が前記第1のフィルタの面積よりも小さいことを特徴とする試料調製装置。

28．第1の貫通孔（601，602，603，604）と，上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口（611－1，612－1，613－3，614－4）と，前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の部材（600）と，前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し，蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の部材（620b）と，疏水性の第3のフィルタを有する第3の部材（630）と，第2の貫通孔（611'－2，612'－2，613'－2，614'－2）と上部に第2の開口（611－2，612－2，613－2，614－2）を有する透明な第4の部材（620a）と，前記PCR増幅反応試薬の温度を制御する手段（640）とを具備し，上方から，前記第1の部材，前記第4の部材，前記第2の部材，前記第3の部材の順に配置され，前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し，前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され，前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成される複数の試料調製ユ

4 6

ニットを有することを特徴とする試料調製装置。

29. 請求の範囲第28項記載の試料調製装置に於いて、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材が、シリコン基板から形成され、前記第1のフィルタ、前記第2のフィルタ、前記第2のフィルタの孔が、前記シリコン基板に形成された孔であることを特徴とする試料調製装置。

30. 請求の範囲第28項記載の試料調製装置に於いて、前記第2のフィルタの面積が前記第1のフィルタの面積よりも小さいことを特徴とする試料調製装置。

31. 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(511-1, 512-1, 513-1, 514-4; 611-1, 612-1, 613-1, 614-4)と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(500, 600)と、上部に第2の開口(511-2, 512-2, 513-2, 514-2; 611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材(520, 620)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(530, 630)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(540, 640)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置と、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにはほぼ垂直な方向から、前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザー光380を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液

47

内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有することを特徴とする遺伝子検査装置。

32. 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(511-1, 512-1, 513-1, 514-4)と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(500)と、上部に第2の開口(511-2, 512-2, 513-2, 514-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材(520)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(530)と、貫通孔(511-5, 512-5, 513-5, 514-5)が形成される第4の領域を複数有する透明な第4の部材(510)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(540)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して構成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有することを特徴とする遺伝子検査装置。

48

33. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(611-1, 612-1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(600)と、上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材(620)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(630)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(640)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2の開口(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)とが対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光(380)を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有することを特徴とする遺伝子検査装置。

34. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(611-1, 612-1

49

1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(600)と、前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材(620b)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(630)と、第2の貫通孔(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)と上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2)を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材(620a)と、前記PCR増幅反応試薬の温度を制御する手段(640)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットと、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザー光(380)を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する照射手段と、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する検出手段とを有することを特徴とする遺伝子検査装置。

35. 上部に形成された第1の開口(511-1, 512-1, 513-1, 514-4; 611-1, 612-1, 613-1, 614-4)と、下部に形成された第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の

50

部材(500, 600)と, 上部に第2の開口(511-2, 512-2, 513-2, 514-2; 611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し下部に第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材(520, 620)と, 疎水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(530, 630)とを有し, 上方から, 前記第1の部材, 前記第2の部材, 前記第3の部材の順に配置され, 前記第1の領域, 前記第2の領域, 前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有する試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって, (1) 前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して, 前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と, (2) 前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と, (3) 蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を, 前記第1の開口に注入して, 前記PCR増幅反応溶液を前記第2のフィルタに保持して, 前記コピーを増幅させる工程と, (4) 前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から, 前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光380を, 前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と, (5) 前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を, 前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有することを特徴とする遺伝子検査方法。

36. 上部に形成された第1の開口(511-1, 512-1, 513-1, 514-4)と, 下部に形成された第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(500)と, 上部に第2の開口(511-2, 512-2, 513-2, 514-2)を有し下部に第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材(520)と, 疎水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(530)と, 貫通

51

孔(511-5, 512-5, 513-5, 514-5)を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材(510)とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有し、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向する試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって、(1)前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、(2)前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)前記第1の開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光380を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、(5)前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有することを特徴とする遺伝子検査方法。

37. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成された第1の開口(611-1, 612-1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成された第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(600)と、上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し下部に第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材(620)と、疏水性の第3のフィルタを有す

5 2

る第3の領域が複数形成される第3の部材(630)とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有し、前記第1の貫通孔と前記第2の開口(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)とが対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成される試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって(1)前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、(2)前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)前記第1の開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光(380)を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、(5)前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有することを特徴とする遺伝子検査方法。

38. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(611-1, 612-1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(600)と、前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅さ

53

せるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材(620b)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(630)と、第2の貫通孔(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)と上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2)を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材(620a)とを有し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有し、前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成される試料調製装置を使用する遺伝子検査方法であって、(1)前記第1の開口に細胞を懸濁させた緩衝液を注入して、前記細胞を第1のフィルタに捕捉する工程と、(2)前記第1の開口に変性剤を注入して前記細胞から溶出したポリヌクレオチドを前記第2のフィルタに捕捉する工程と、(3)前記第1の開口に、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を注入して、前記PCR増幅反応溶液を保持して、前記コピーを増幅させる工程と、(4)前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ平行な方向から、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識を励起するレーザ光(380)を、前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液にほぼ同時に照射する工程と、(5)前記各試料調製ユニットの前記PCR増幅反応溶液内の前記コピーを標識する前記蛍光標識からの蛍光を、前記各試料調製ユニットの前記第2のフィルタにほぼ垂直な方向からほぼ同時に検出する工程とを有することを特徴とする遺伝子検査方法。

39. 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部に形成された第1の開口(5

5 4

1 1-1, 5 1 2-1, 5 1 3-1, 5 1 4-4; 6 1 1-1, 6 1 2-1, 6 1 3-1, 6 1 4-4)と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(5 0 0, 6 0 0)と、上部に第2の開口(5 1 1-2, 5 1 2-2, 5 1 3-2, 5 1 4-2; 6 1 1-2, 6 1 2-2, 6 1 3-2, 6 1 4-2; 6 1 1'-2, 6 1 2'-2, 6 1 3'-2, 6 1 4'-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材(5 2 0, 6 2 0)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(5 3 0, 6 3 0)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(5 4 0, 6 4 0)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

4 0. 上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(5 1 1-1, 5 1 2-1, 5 1 3-1, 5 1 4-4)と、下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(5 0 0)と、上部に第2の開口(5 1 1-2, 5 1 2-2, 5 1 3-2, 5 1 4-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材(5 2 0)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(5 3 0)と、貫通孔(5 1 1-5, 5 1 2-5, 5 1 3-5, 5 1 4-5)が形成される第4の領域を複数有し透明な第4の部材(5 1 0)

5 5

と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(540)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとが前記貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向し、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

41. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(611-1, 612-1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(600)と、上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2; 611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)を有し前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタを下部に有する第2の領域が複数形成される第2の部材(620)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(630)と、前記PCR増幅反応溶液の温度を制御(640)する手段とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2の開口(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)とが対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

42. 第1の貫通孔(601, 602, 603, 604)と、上部に形成され細胞を懸濁させた緩衝液が注入される第1の開口(611-1, 612-

56

1, 613-3, 614-4)と、前記第1の開口の下部に形成され前記細胞を捕捉する第1のフィルタとを有する第1の領域が複数形成される第1の部材(600)と、前記第1の開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のためのPCR増幅反応試薬を含む溶液を保持する第2のフィルタを有する第2の領域が複数形成される第2の部材(620b)と、疏水性の第3のフィルタを有する第3の領域が複数形成される第3の部材(630)と、第2の貫通孔(611'-2, 612'-2, 613'-2, 614'-2)と上部に第2の開口(611-2, 612-2, 613-2, 614-2)を有する第4の領域が複数形成される透明な第4の部材(620a)と、前記PCR増幅反応試薬の温度を制御する手段(640)とを具備し、上方から、前記第1の部材、前記第4の部材、前記第2の部材、前記第3の部材の順に配置され、前記第1の貫通孔と前記第2のフィルタとが前記第2の貫通孔を介して対向し、前記第2のフィルタと前記第3のフィルタとが対向して配置され、前記第1のフィルタと前記第2のフィルタとを結ぶ流路が形成され、前記第1の領域、前記第2の領域、前記第3の領域、前記第4の領域を持つ複数の試料調製ユニットを有することを特徴とする試料調製装置。

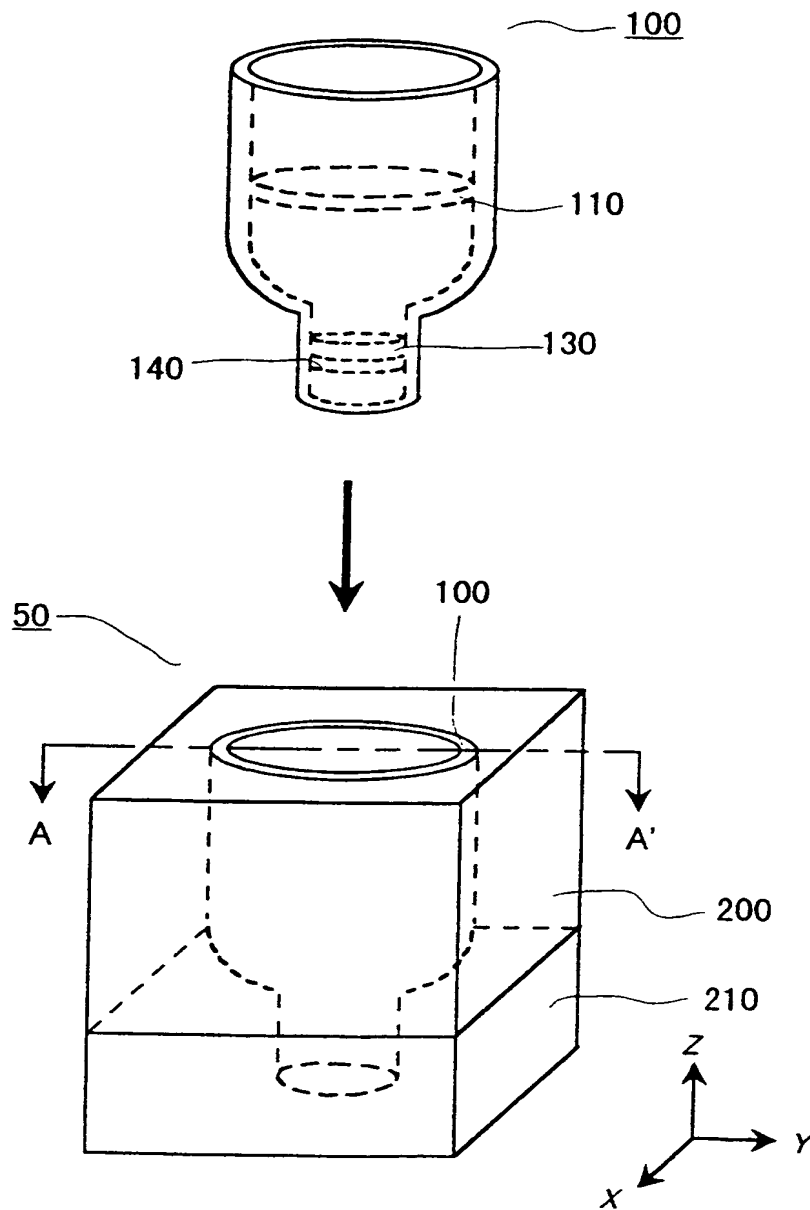
43. 細胞を懸濁させた緩衝液が注入される上部開口と、廃液を流出させる下部開口とを結ぶ流路を有し、前記上部開口から前記下部開口の方向に前記流路にそれぞれ順次配置される、前記細胞を捕捉する第1のフィルタ(110)と、前記上部開口から注入された変性剤により前記細胞から溶出されたポリヌクレオチドを捕捉し、蛍光標識されたPCR用のプライマーを含み前記ポリヌクレオチドの所望の塩基配列の部分のコピーを増幅させるPCR増幅反応のための試薬を含むPCR増幅反応溶液を保持する第2のフィルタ(130)と、疏水性の第3のフィルタ(140)とを有する試料調製ユニット(100)と、前記試料調製ユニットを保持する保持手段(200)と、

57

前記PCR増幅反応溶液の温度を制御する手段(210)とを具備する試料調製装置

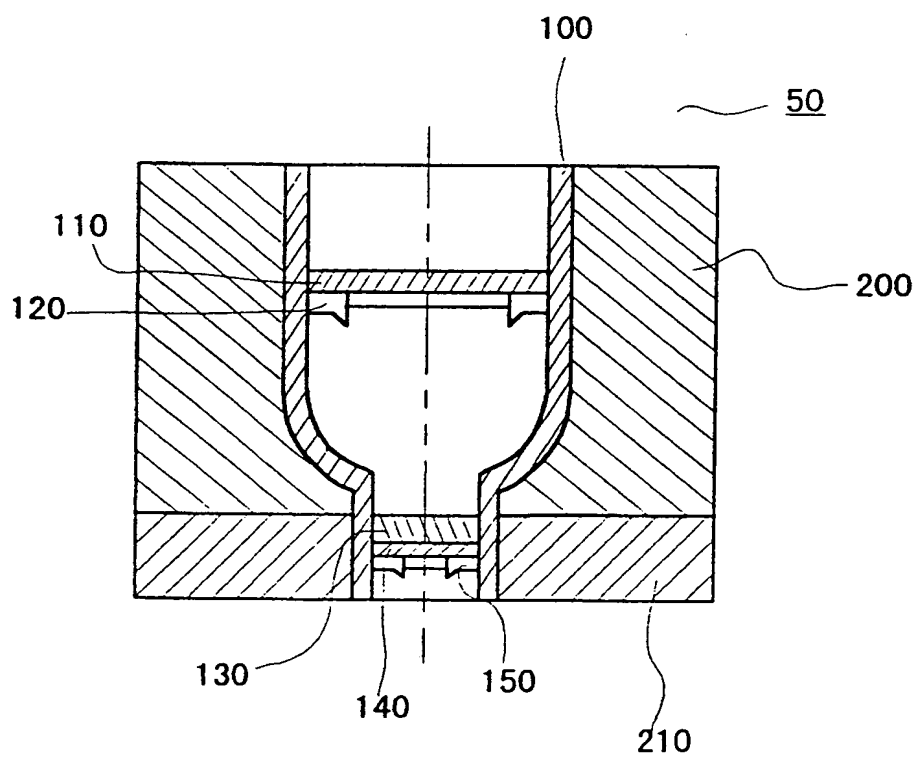
1/27

第1図



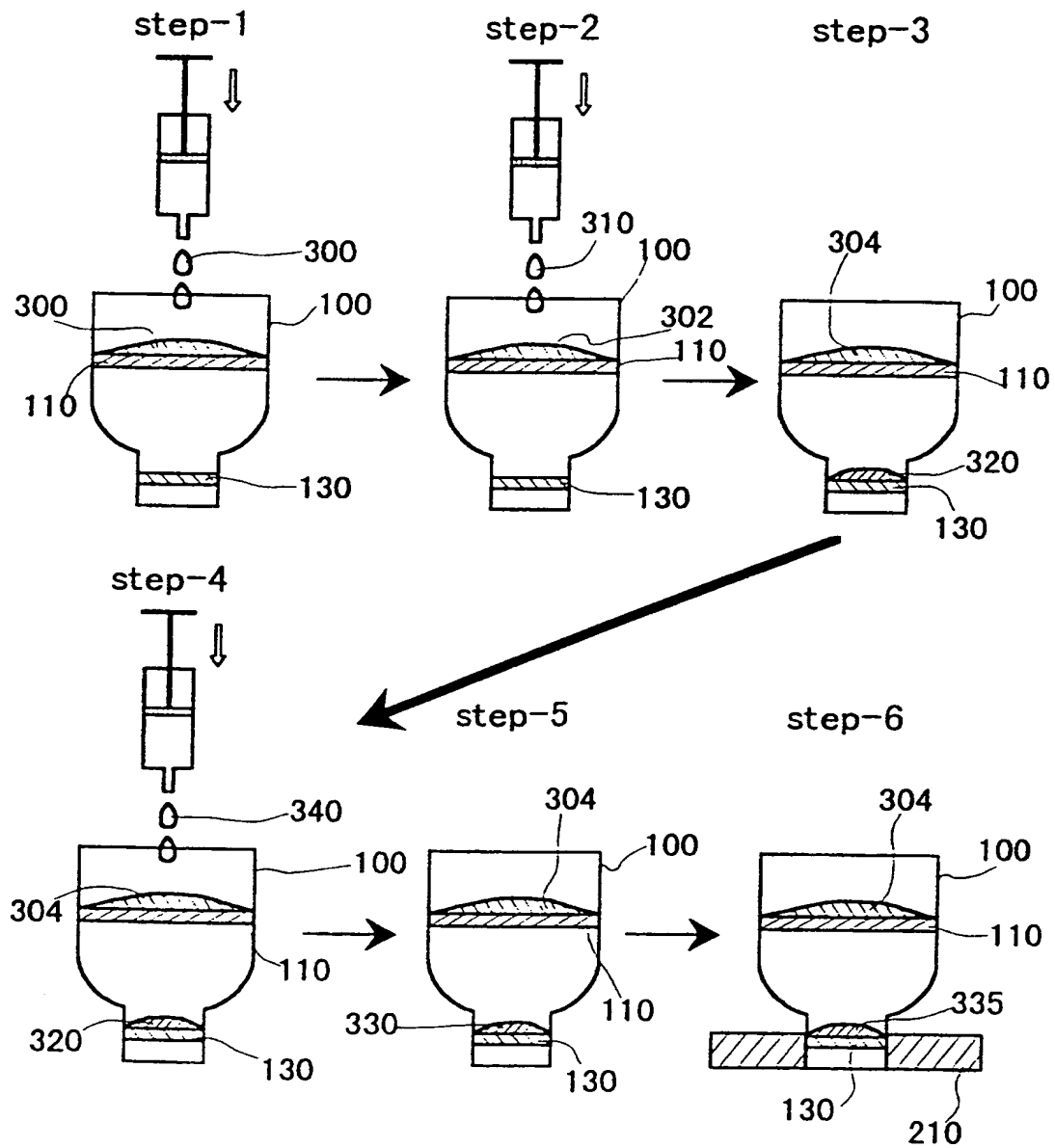
2/27

第2図



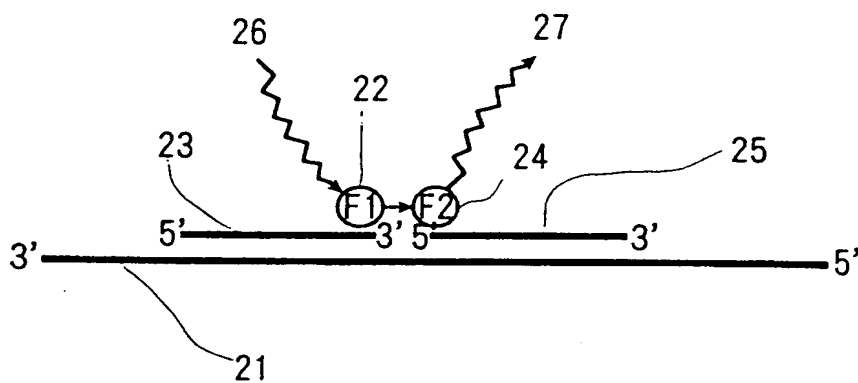
3/27

第3図



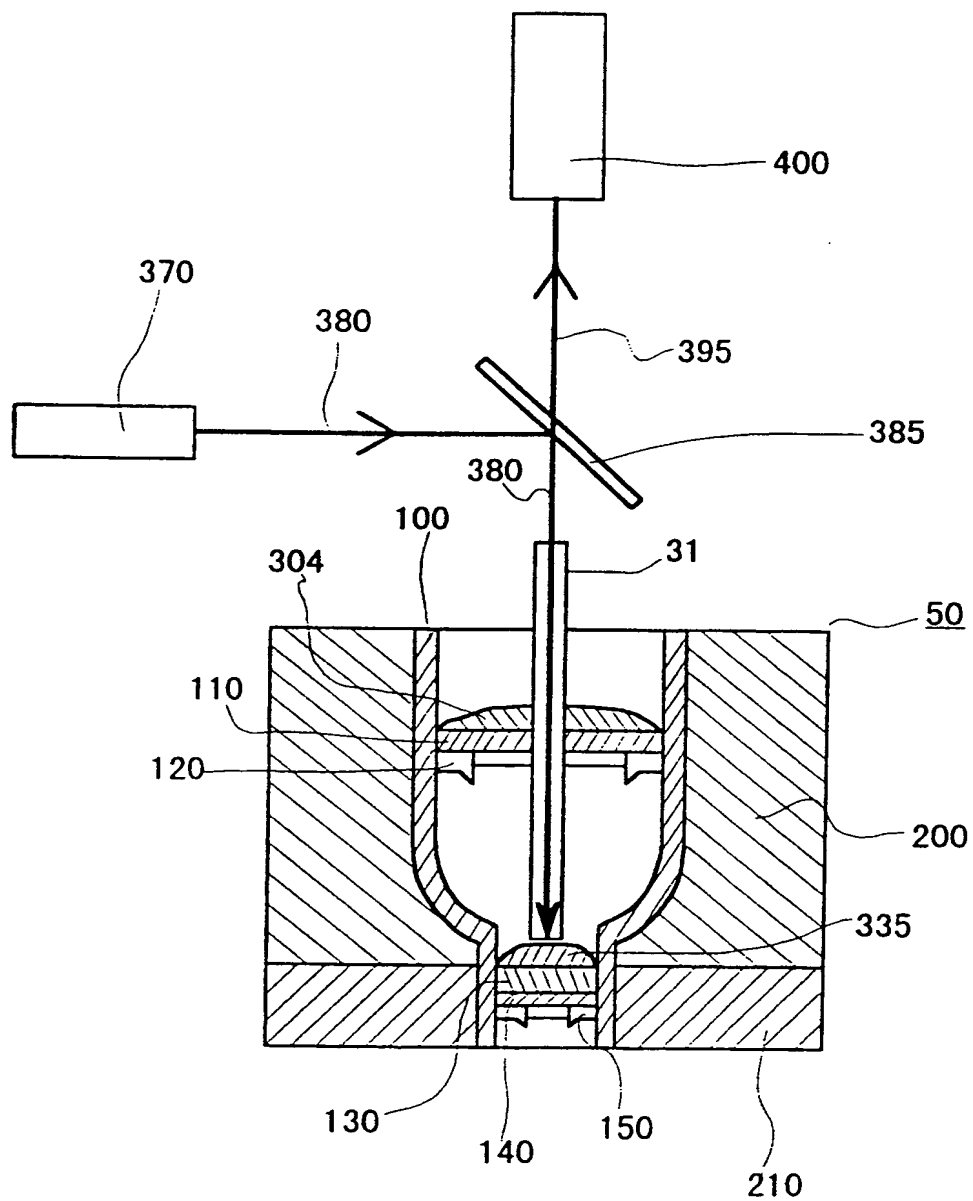
4/27

第4図



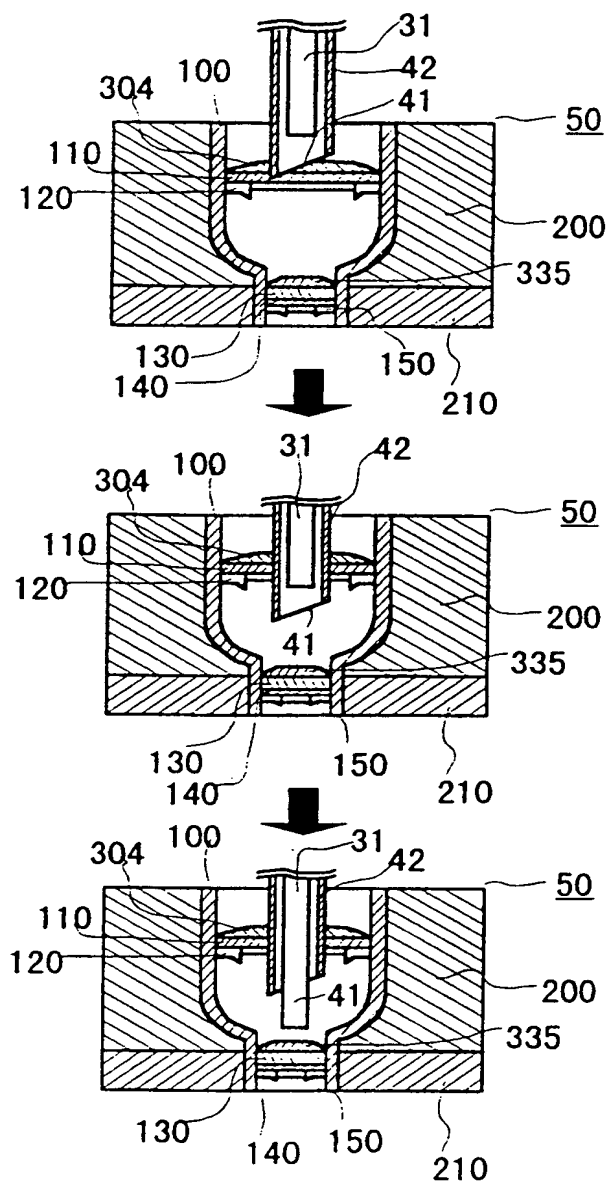
5/27

第5図



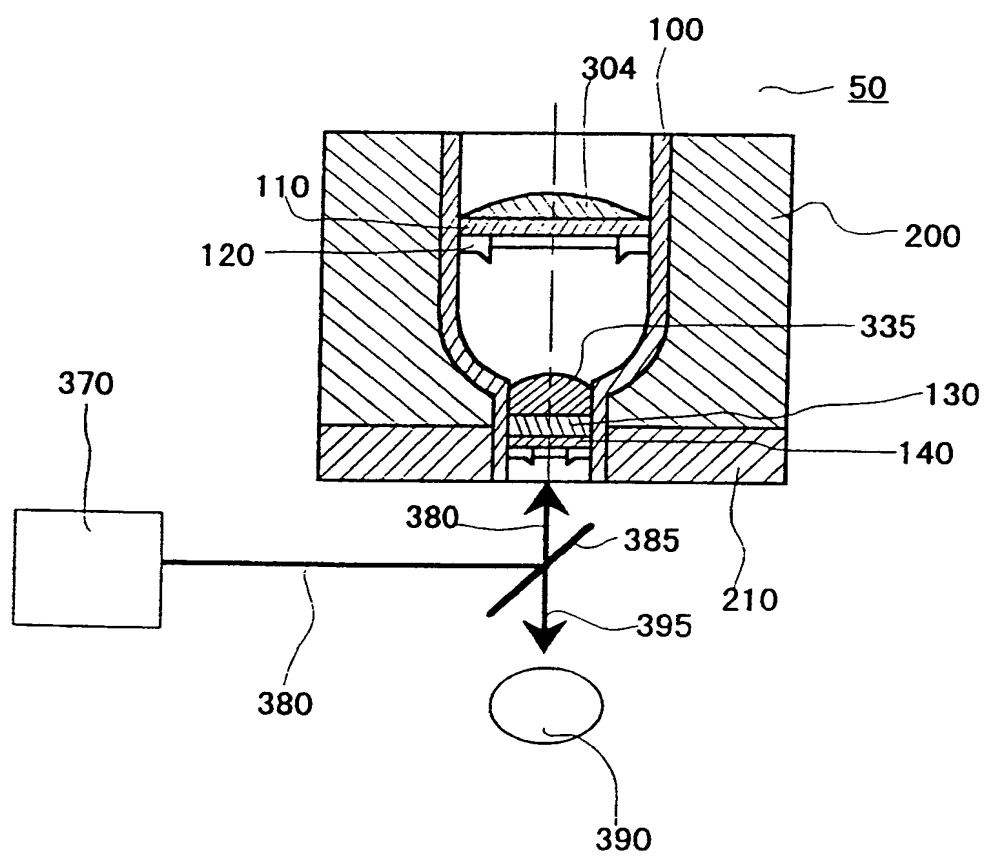
6/27

第6図



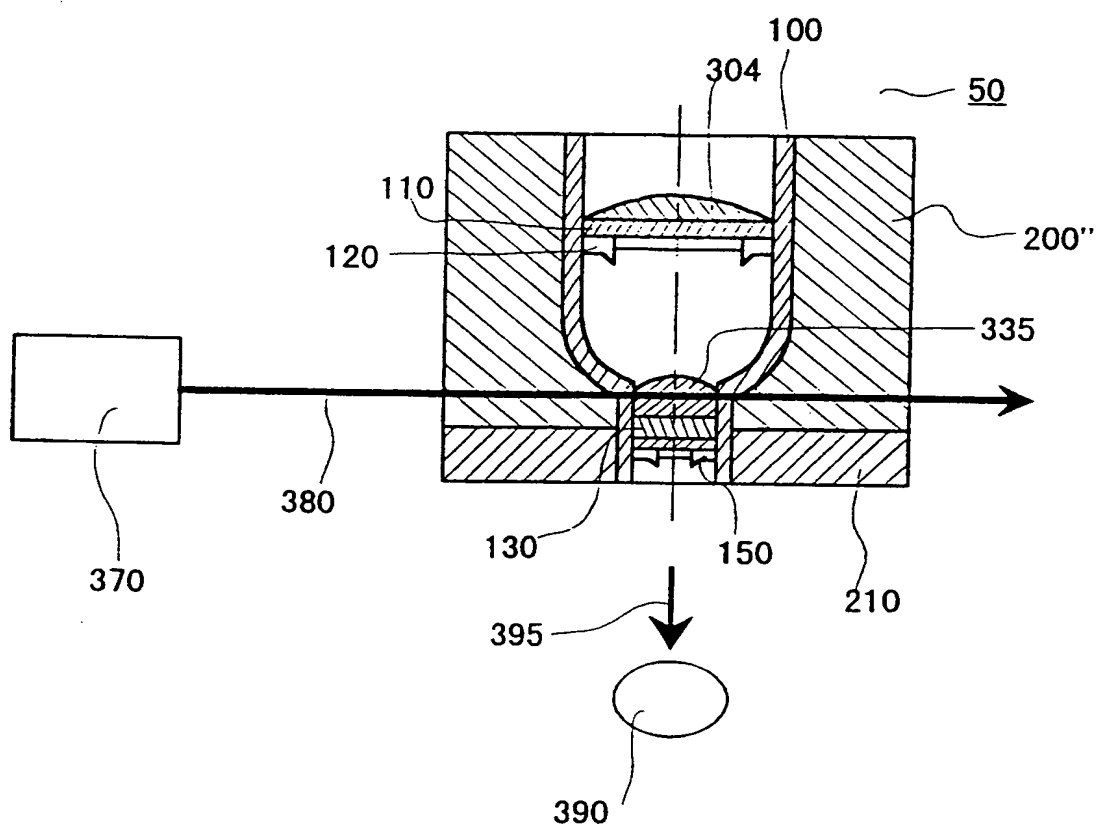
7/27

第7図



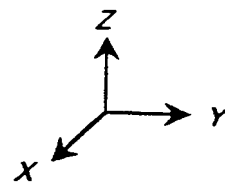
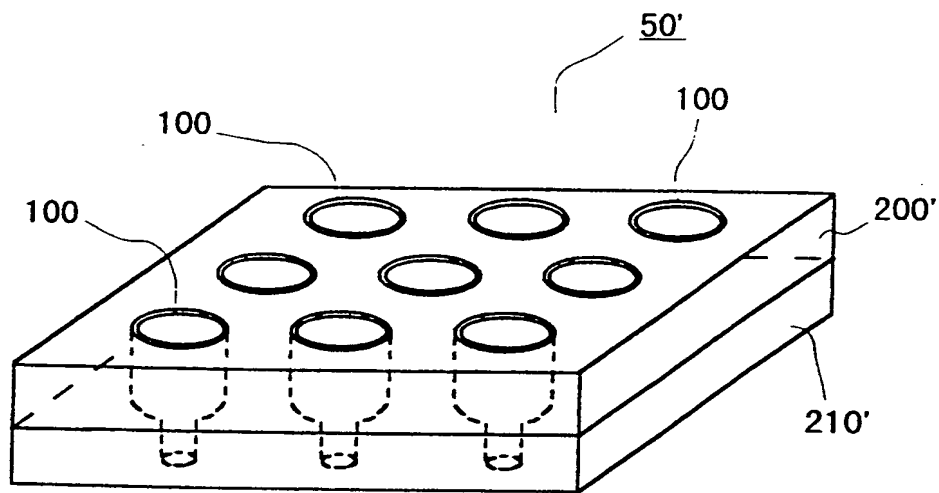
8/27

第8図



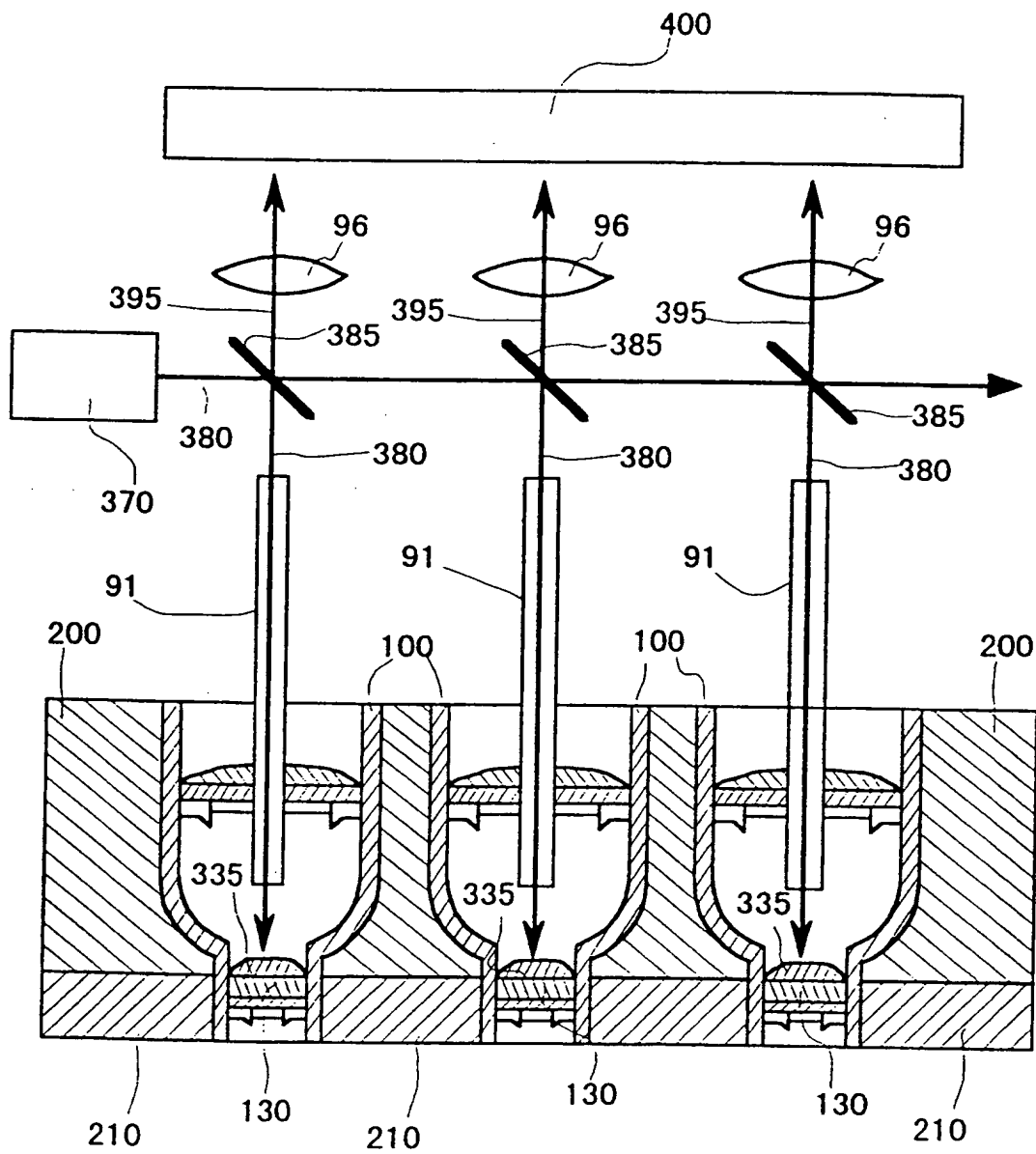
9/27

第9図



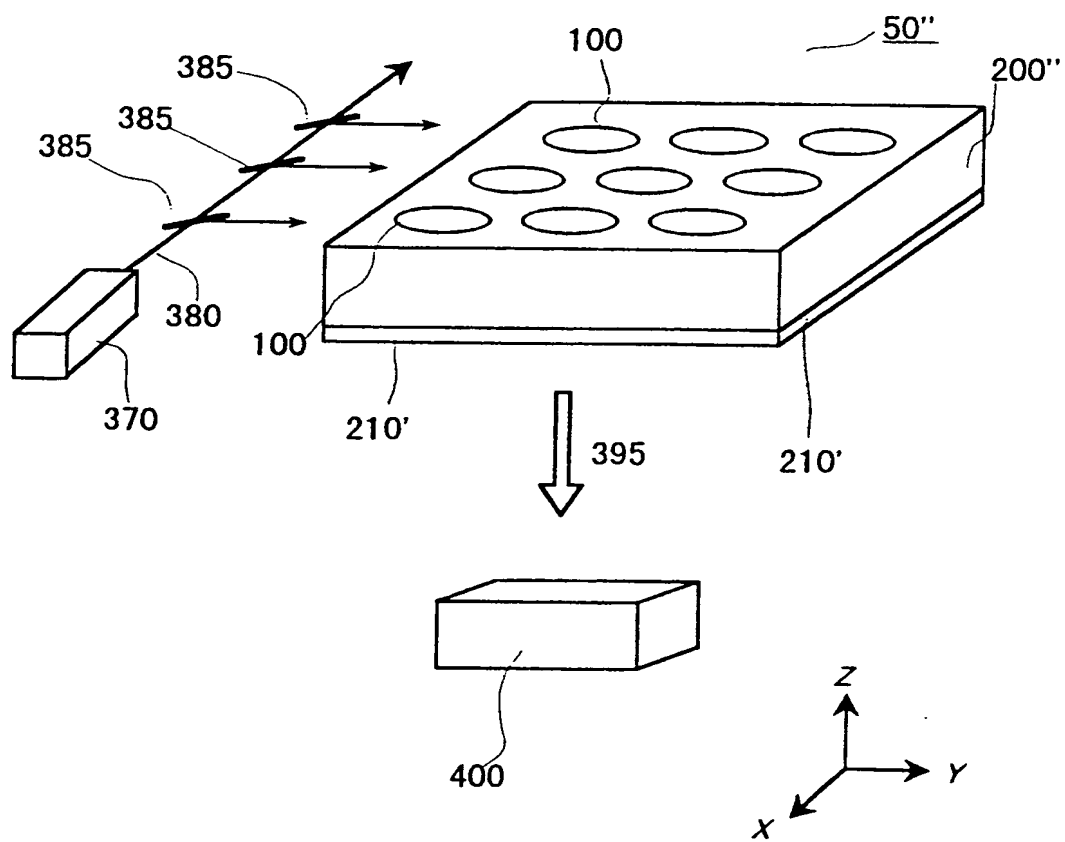
10/27

第10図



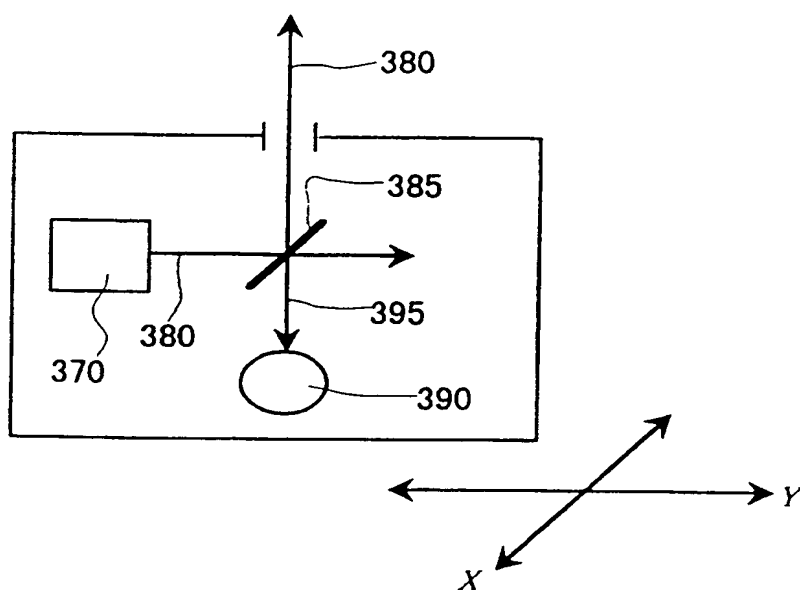
11/27

第11図



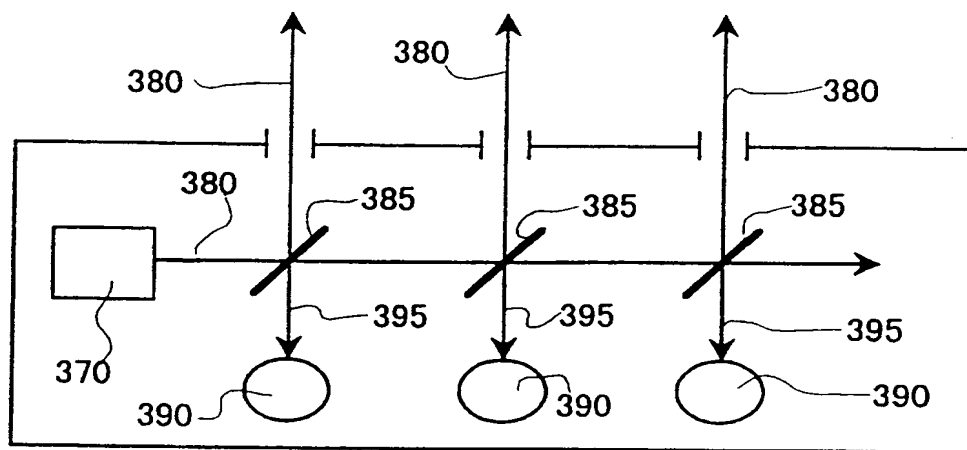
12/
27

第12図



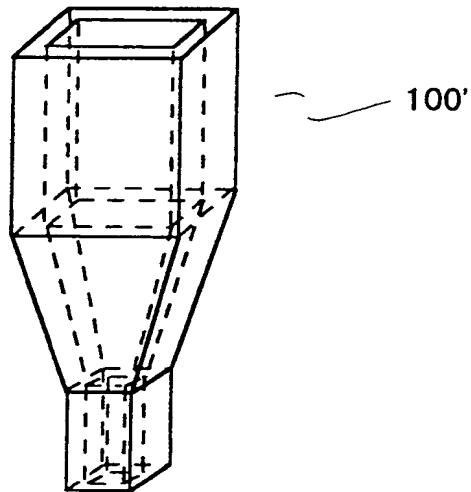
13/27

第13図

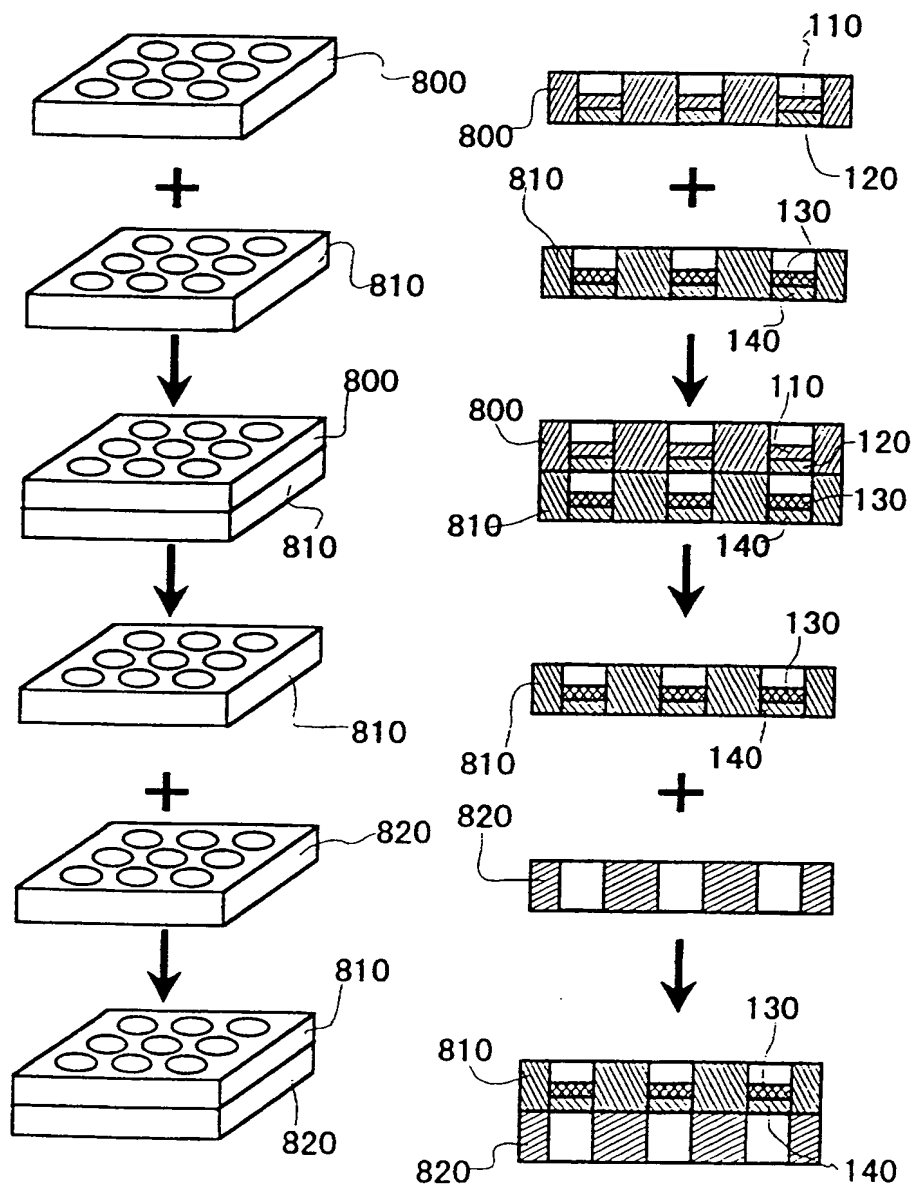


14/27

第14図

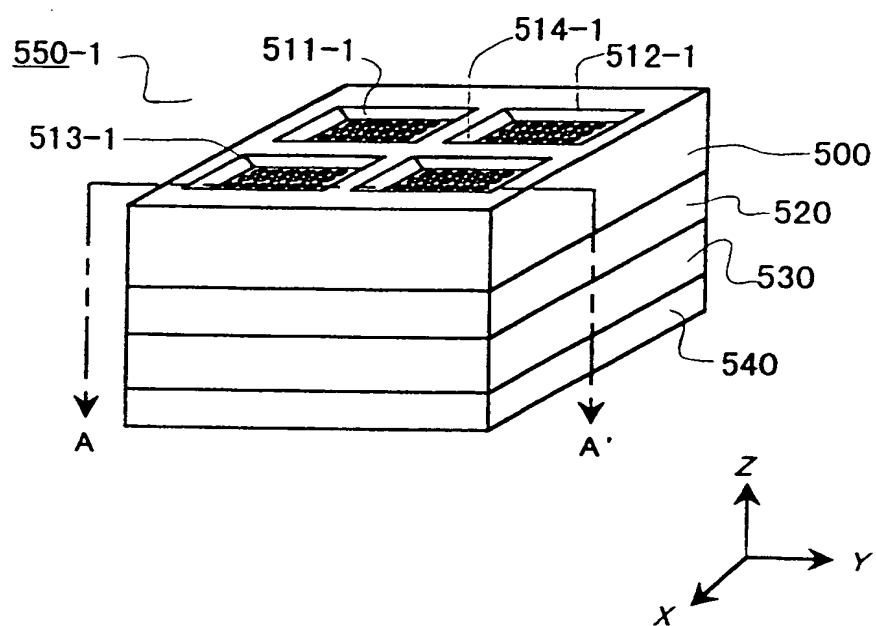


第15図



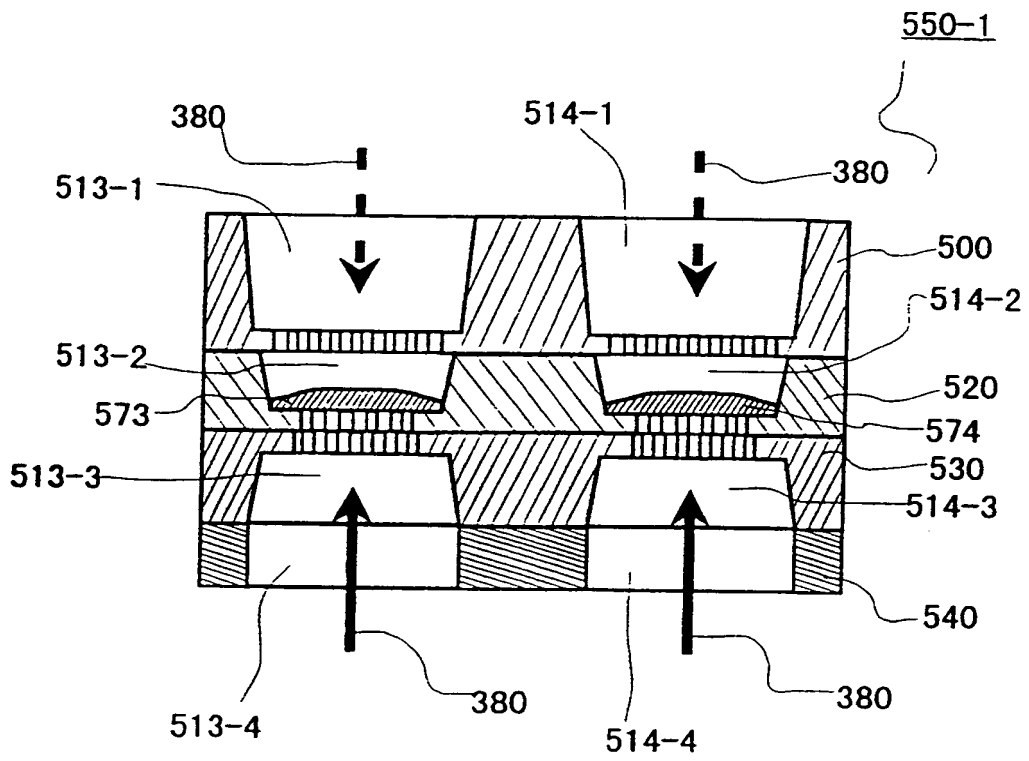
16/27

第16図



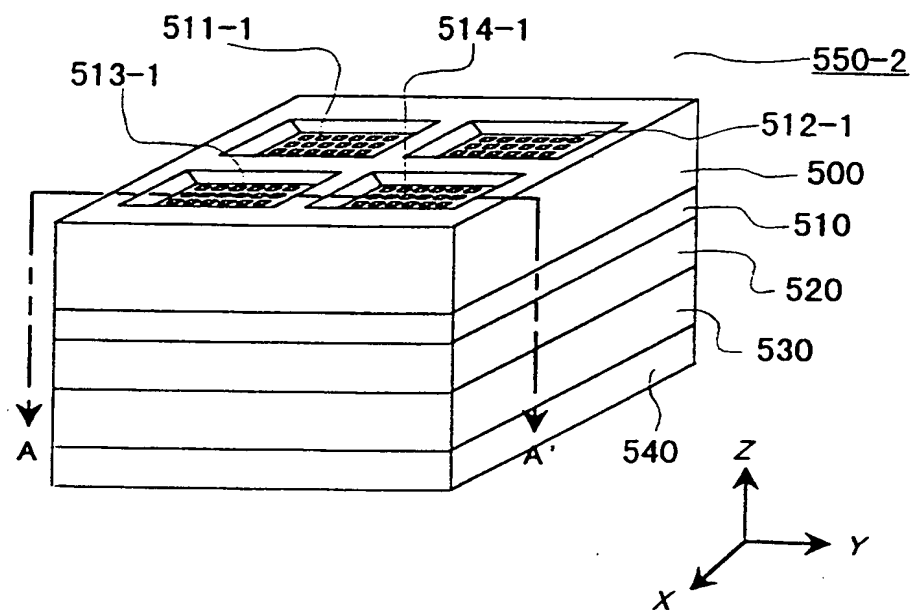
17/27

第17図



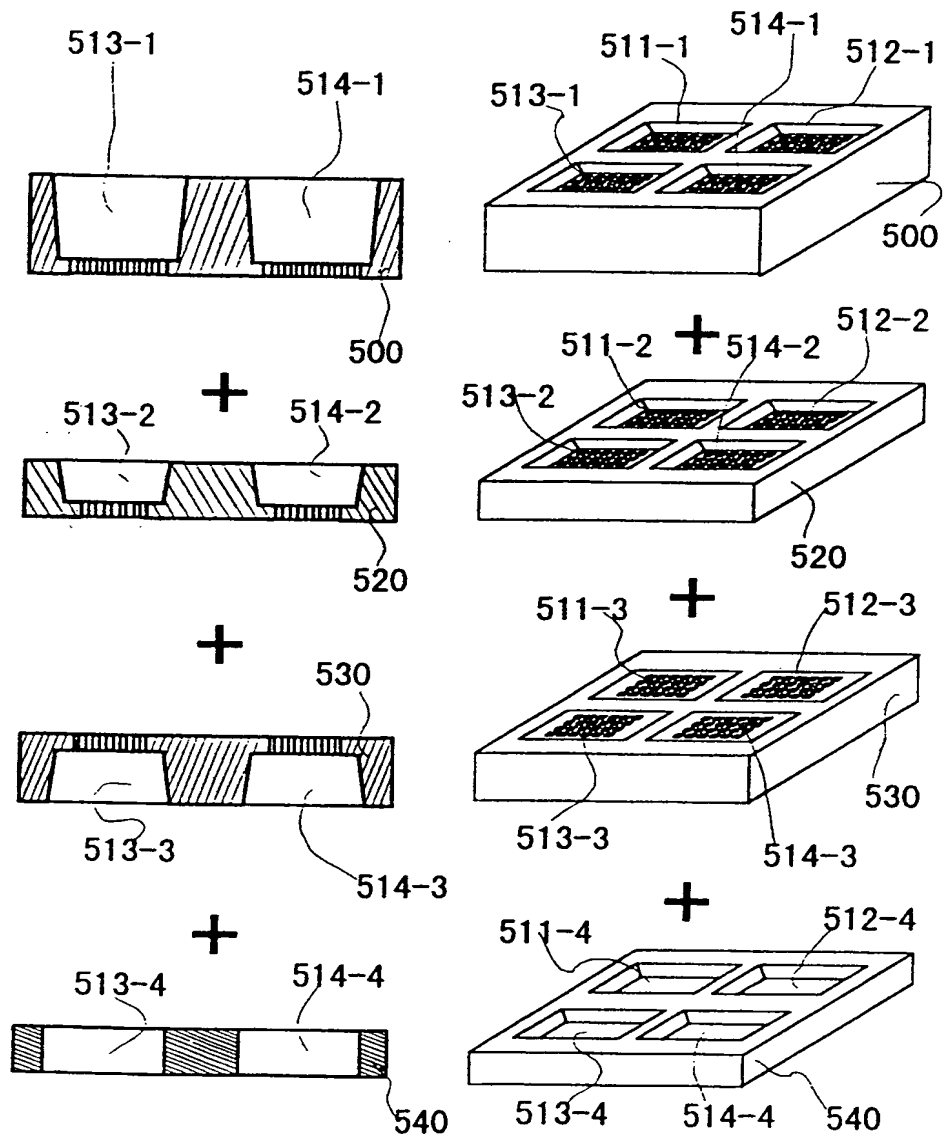
19/27

第19図



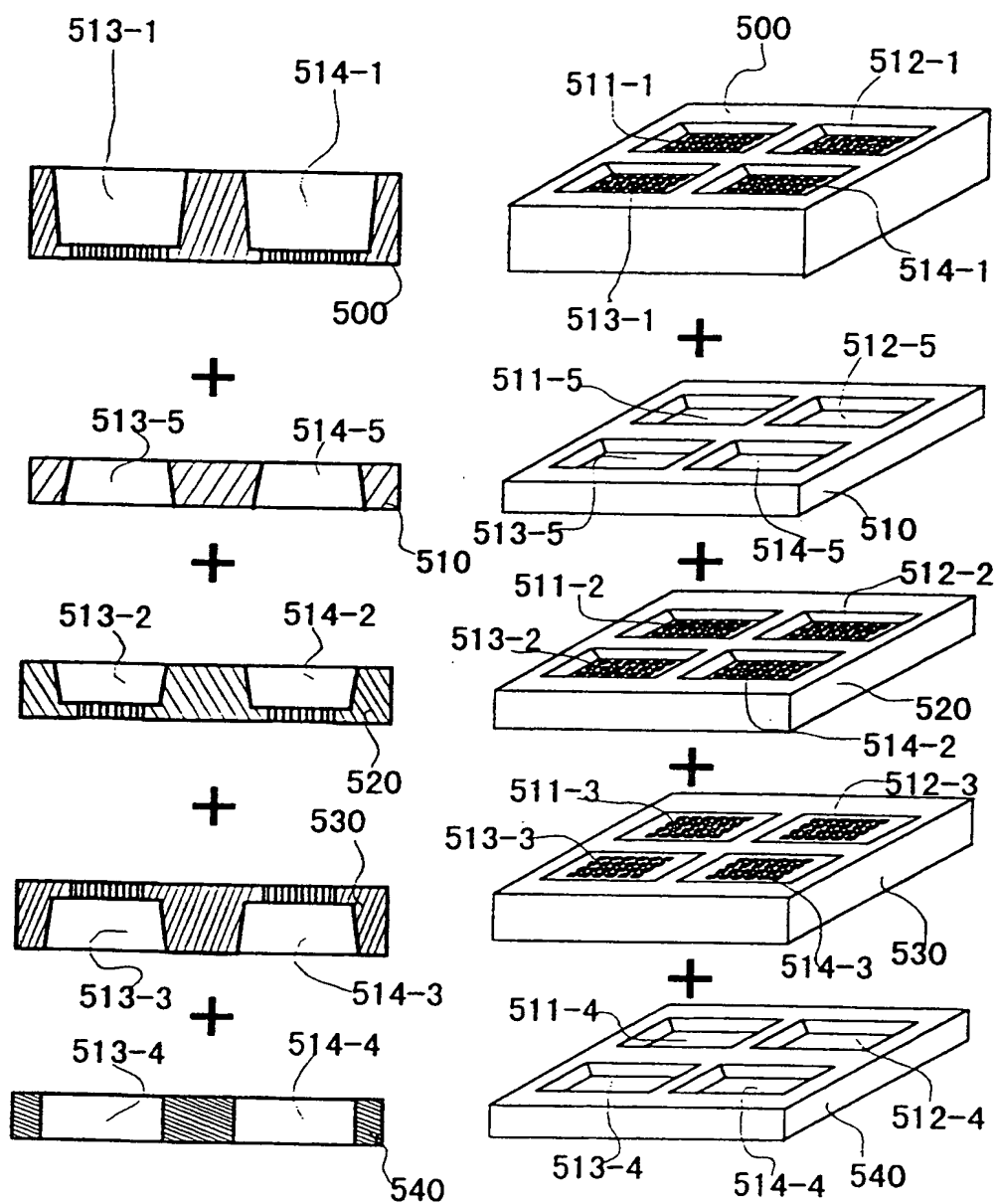
18/27

第18図



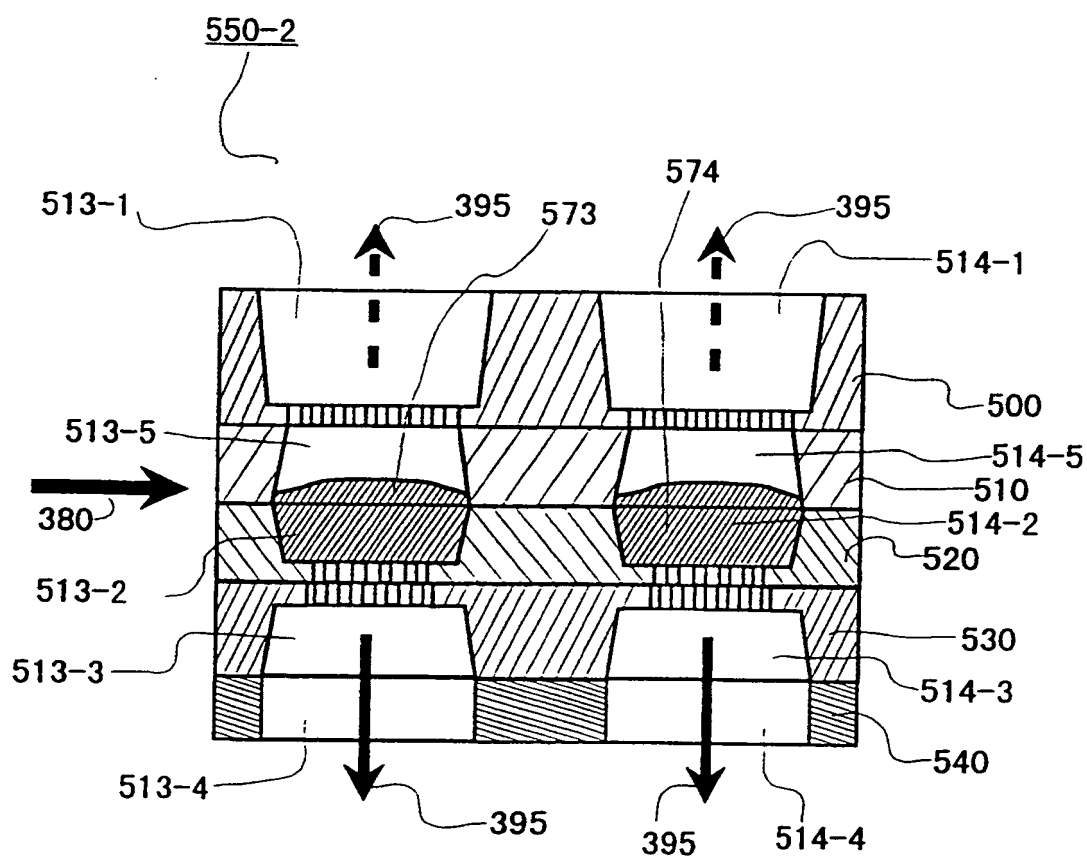
21/27

第21図

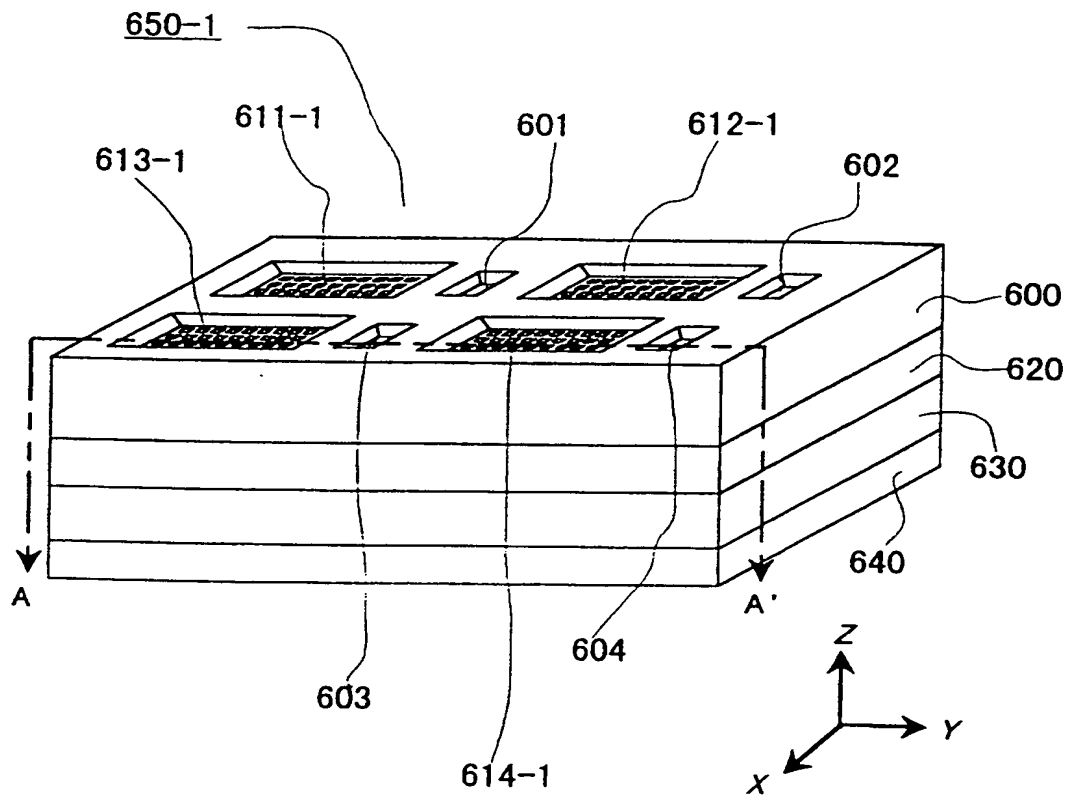


20/27

第20図

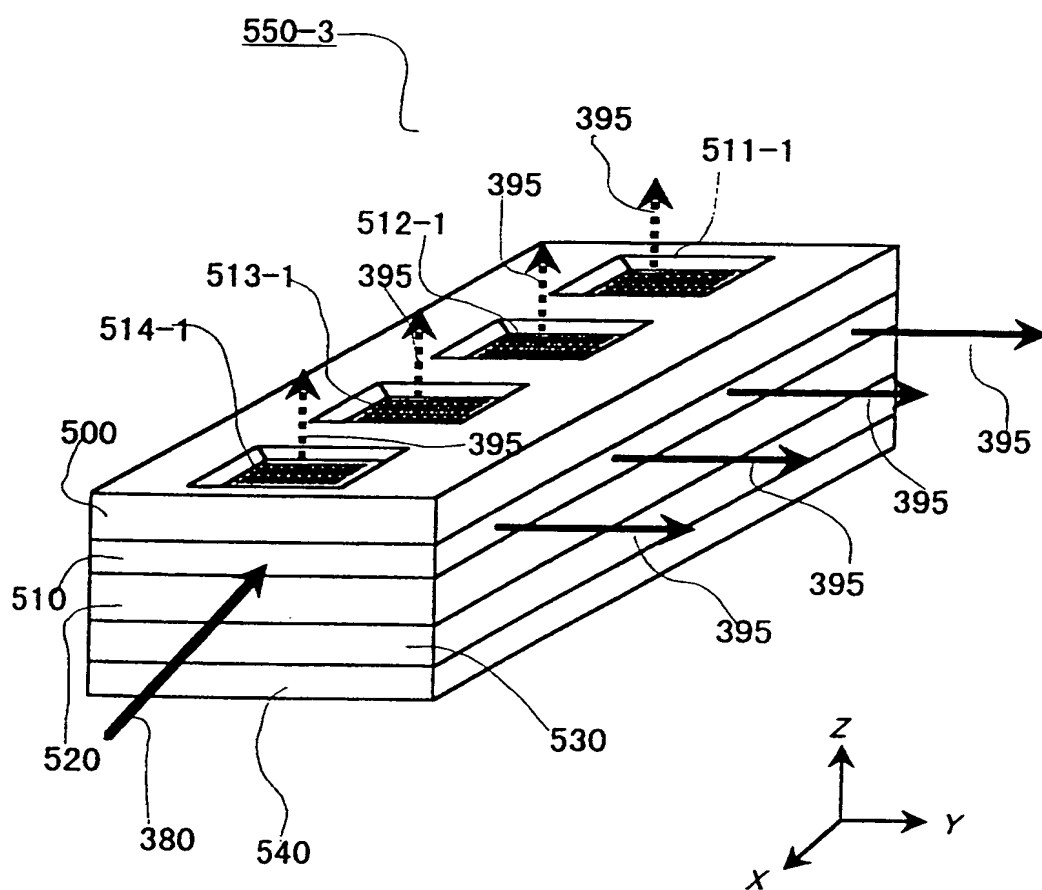


第23図



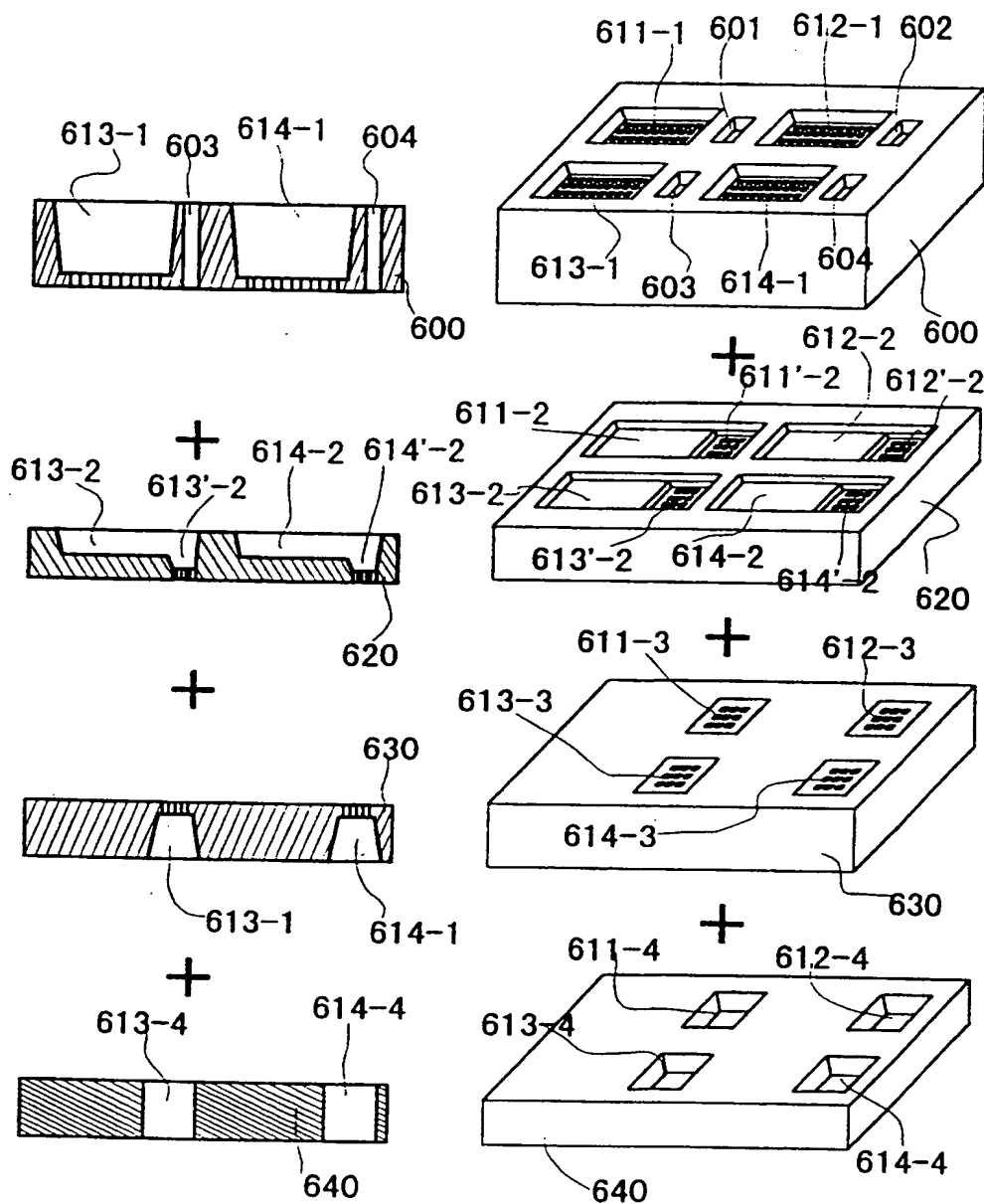
22/
27

第22図



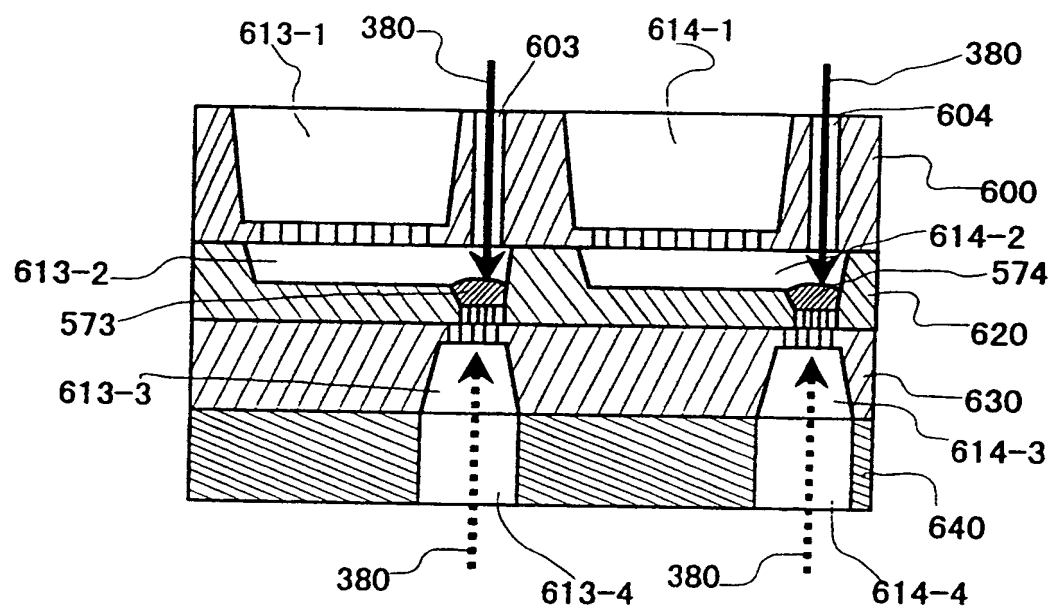
25/27

第25図



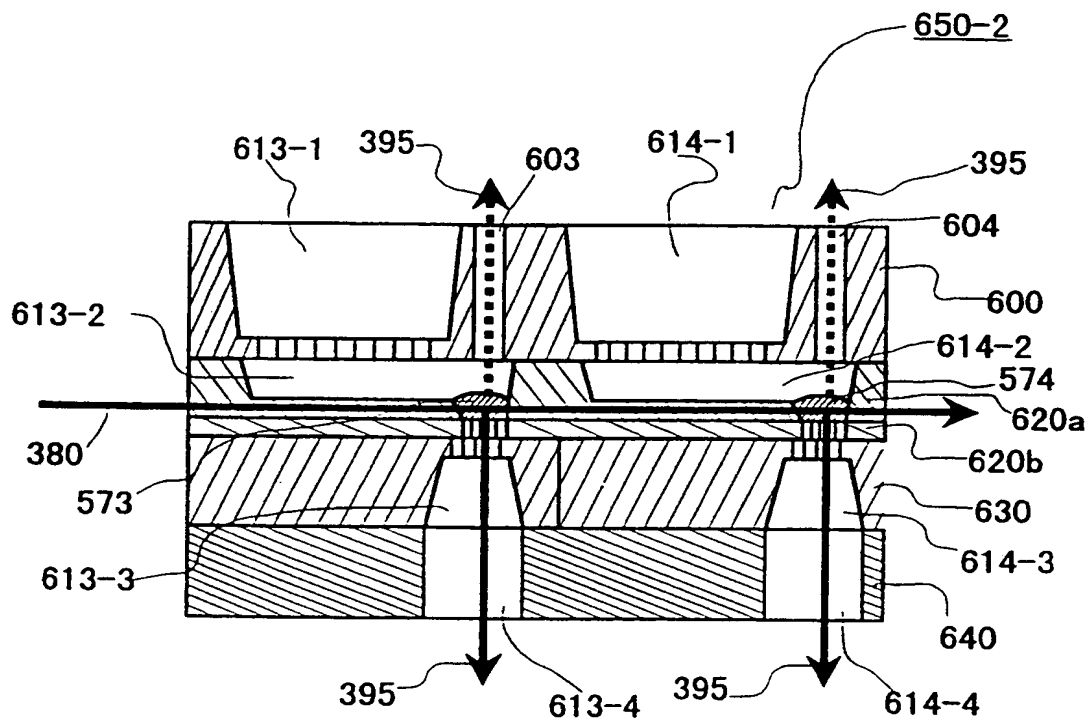
24/27

第24図



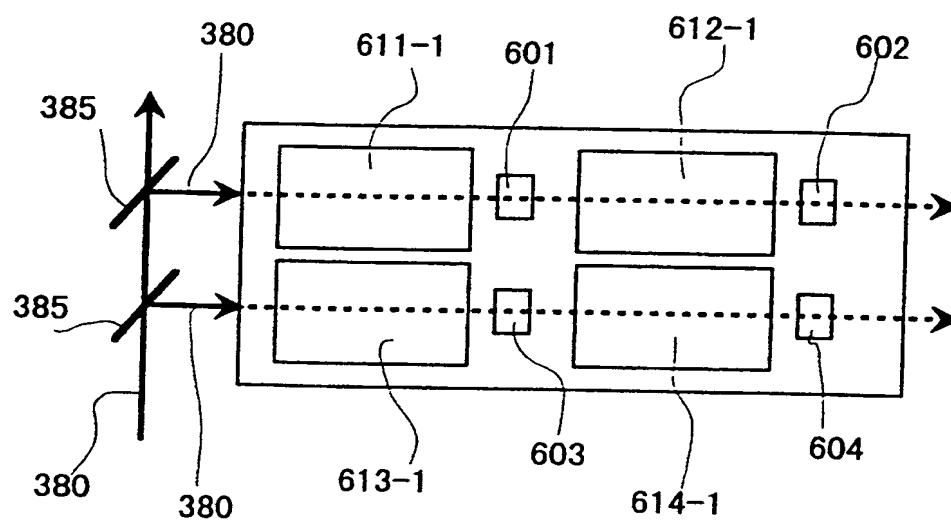
27/27

第27図



26/27

第26図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03209

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-275800, A (Becton, Dickinson and Co.), 22 October, 1996 (22. 10. 96) & EP, 733714, A2 & AU, 9648116, A & CA, 2171059, A & US, 5725831, A	1-43
A	JP, 8-266267, A (Becton, Dickinson and Co.), 15 October, 1996 (15. 10. 96) & EP, 733905, A2 & US, 5578270, A & CA, 2172210, A	1-43
A	JP, 7-107999, A (Hitachi, Ltd.), 25 April, 1995 (25. 04. 95) (Family: none)	1-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12M1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12M1/00-1/42, G01N35/00-35/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/03348, A1 (Immunological Associates of Denver), 30 January, 1997 (30. 01. 97) & AU, 9664580, A & EP, 838025, A1 & JP, 11-509100, A	1-43
A	JP, 10-257887, A (Dainippon Printing Co., Ltd.), 29 September, 1998 (29. 09. 98) (Family: none)	1-43
A	JP, 10-239300, A (Japan Science and Technology Corp.), 11 September, 1998 (11. 09. 98) (Family: none)	1-43
A	JP, 10-505497, A (Nanogen Inc.), 2 June, 1998 (02. 06. 98) & WO, 96/07917, A1 & US, 5632957, A & EP, 871888, A1 & AU, 9535070, A & FI, 9700957, A	1-43

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
2 September, 1999 (02. 09. 99)

Date of mailing of the international search report
14 September, 1999 (14. 09. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 10-505497, A (ナノゲン・インコーポレイテッド) 02. 6月. 1998 (02. 06. 98) & WO, 96/07917, A1 & US, 5632957, A & EP, 871888, A1 & AU, 9535070, A & FI, 9700957, A	1 - 4 3
A	JP, 8-275800, A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) 22. 10月. 1996 (22. 10. 96) & EP, 733714, A2 & AU, 9648116, A & CA, 2171059, A & US, 5725831, A	1 - 4 3
A	JP, 8-266267, A (ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー) 15. 10月. 1996 (15. 10. 96) & EP, 733905, A2 & US, 5578270, A & CA, 2172210, A	1 - 4 3
A	JP, 7-107999, A (株式会社日立製作所) 25. 4月. 1995 (25. 04. 95) ファミリーなし	1 - 4 3

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/03209

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12M1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ C12Q1/68, C12M1/00-1/42, G01N35/00-35/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/03348, A1 (イムノロジカル アソシエーツ オブ デンバー) 30. 1月. 1997 (30. 01. 97) & AU, 9664580, A & EP, 838025, A1 & JP, 11-509100, A	1-43
A	JP, 10-257887, A (大日本印刷株式会社) 29. 9月. 1998 (29. 09. 98) ファミリーなし	1-43
A	JP, 10-239300, A (科学技術振興事業団) 11. 9月. 1998 (11. 09. 98) ファミリーなし	1-43

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02. 09. 99

国際調査報告の発送日

14.09.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)